

**FACULTAD DE BIOLOGÍA, CIENCIAS AMBIENTALES Y
QUÍMICA**

**Departamento de Química Analítica, Química Física e
Ingeniería Química**



**CARACTERIZACIÓN, DETERMINACIÓN DE VITAMINAS
HIDROSOLUBLES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MIELES
MONOFLORALES DE CASTILLA LA MANCHA**

VIRGINIA LEÓN RUIZ

Septiembre, 2013

MARÍA PAZ SAN ANDRÉS LLEDÓ y SOLEDAD VERA LÓPEZ, ambas Profesoras Titulares de Química Analítica del Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá y AMELIA VIRGINIA GONZÁLEZ PORTO, Técnico Superior de Investigación del Centro Agrario de Marchamalo perteneciente a la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha

CERTIFICAN:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado **"CARACTERIZACIÓN, DETERMINACIÓN DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MIELES MONOFLORALES DE CASTILLA-LA MANCHA"**, ha sido realizado bajo su dirección por Dña. Virginia León Ruiz en el Área de Química Analítica del Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de esta Universidad y en el Laboratorio de Mieles del Centro Agrario de Marchamalo perteneciente a la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, a excepción de parte del trabajo descrito en el Capítulo V que ha sido llevado a cabo en el Departamento de Ciencias de los Alimentos y Nutricionales de la Universidad Reading (Berkshire, Reino Unido). Asimismo, autorizan su presentación para que sea defendido como Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente en Alcalá de Henares a 5 de julio de 2013.

ALBERTO ESCARPA MIGUEL, Profesor Titular de Química Analítica y Director del Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado **"CARACTERIZACIÓN, DETERMINACIÓN DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MIELES MONOFLORALES DE CASTILLA-LA MANCHA"**, ha sido realizado en este departamento por Dña. Virginia León Ruiz bajo la dirección de las Dras. María Paz San Andrés Lledó y Soledad Vera López, ambas Profesoras Titulares de dicho departamento, y la Dra. Amelia Virginia González Porto, Técnico Superior de Investigación del Centro Agrario de Marchamalo perteneciente a la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

Que parte del trabajo experimental recogido en el Capítulo V ha sido llevado a cabo en el Departamento de Ciencias de los Alimentos y Nutricionales de la Universidad Reading (Berkshire, Reino Unido).

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente en Alcalá de Henares a 5 de julio de 2013.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la concesión de una beca pre-doctoral de la Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Orden de 18/12/2006, para la formación de personal investigador en materia de Investigación y Tecnología Agraria y alimentaria, y a la financiación recibida del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (Proyecto RTA2007-00072-C03) y de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (proyectos 05-299/LA-47 y PAI09-0018-9267).

En el ámbito profesional y personal, quiero acordarme de todas las personas que han formado parte de esta tesis, que tanto esfuerzo y dedicación ha llevado realizarla, y agradecer, de corazón, su participación.

*En primer lugar quiero agradecer a mis directoras de tesis, a las Dras. Amelia Virginia González Porto, María Paz San Andrés Lledó y Soledad Vera López, por todo el tiempo invertido en la dirección y corrección de esta tesis. En concreto, a Meli, por la oportunidad que me brindó de profundizar en este **apasionante** mundo de la miel. Por sus enseñanzas, su trato tan cercano, su apoyo, confianza y comprensión cuando lo he necesitado. A MPaz y MSol, con quienes comencé mis andaduras profesionales y continué tiempo después, cuando aceptaron ser directoras de esta tesis, gracias por haberme acogido en vuestro grupo de investigación, por haberme enseñado a trabajar con diferentes técnicas analíticas, a tener una calidad en el trabajo, formación en la disciplina científica y a crecer como persona. A MSol, por su permanente disponibilidad y por volcarse tanto, sobre todo en la finalización de esta tesis, y a MPaz, entre otras cosas, gracias por animarme a continuar en los momentos de flaqueza.*

A mis compañeros del Laboratorio de Mieles con los que he ido coincidiendo en mis años de doctorado, por su ayuda e inestimable compañía en el día a día. En especial a Susana, por ser siempre tan voluntariosa, aunque estuviese desbordada de trabajo. A Fede, por un montón de cosas en las que me ha ayudado, que pueden dar casi, para escribir otra tesis, por conseguir que todo funcione en el Laboratorio de Mieles, sobre todo en el tema informático y de organización. A Alberto, por las salidas de campo, sus valiosas enseñanzas de apicultura y los cafés que venían después. A Félix por su ayuda incondicional en el laboratorio y en los cursos que hemos hecho juntos. A Tomi, puff! pues también daría para una tesis...gracias por estar siempre disponible. A Raquel, gracias por ayudar cuando has podido y a José Antonio, mi paisano, también. Y acordarme también del resto de personas con las que coincidí, Noelia, Carmen Abascal, Sonia, Arantxa, que cada una ha aportado algo en este capítulo de mi vida. También de las chicas que estuvieron de estancia en el Laboratorio de Mieles, Olga (Orense), Sandra (Barcelona) y Ana (Burgos).

A mis compañeras de despacho Cris, Ana, Almu y Encarna, todas sumidas en esta vorágine del doctorado, que unas llevaban mejor que otras. A los compañeros del Laboratorio Pecuario con quien he

compartido tan buenos ratos en el desayuno, Isabel, Fernando, Inma, Lola, Javi y Raquel Serrano, además de otros compañeros que se fueron antes de que yo empezara el doctorado, pero que eran parte del “grupo-secta”. Y en general, a todos los compañeros del Centro Agrario de Marchamalo, entre ellos Antonio “ojos azules”, Pepe Padrino, Oscar, More, Ángel, Mariano, Raquel Martín, Antonio, Javi, Carmelo, José Luis, Andrés, Queti, Gema, y muchos más.

A mis compañeros del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Alcalá, Cristina, Virginia, Laura, Miriam, Miguel, Clara, Aída, por su disponible y voluntariosa ayuda en todo lo que he necesitado a lo largo de este tiempo.

También quiero agradecer a los compañeros que tuve en Ciudad Real que, aunque finalmente el trabajo que hice allí no está recogido en la tesis, fue muy enriquecedor para mí. Quiero recordar especialmente a Pedro, allá donde estés, una de las personas más alegre y optimista que he conocido, gracias por enseñarme a ser, un poco, como tú eras. A la Dra. Soledad Pérez Coello, por facilitarme la estancia y a la Dra. Lucía Castro Vázquez, por el trabajo que hicimos juntas. A Rosa por su amistad y a Elena y Silvia, por su ayuda con el análisis sensorial de las mieles de espliego y lavandín.

A la Dras. Paula Jauregi y María José Oruña Concha por darme la oportunidad de trabajar en la Universidad de Reading (Inglaterra) y dejarme disponer de todos los medios a su alcance. Por su asistencia, en todo y para todo.

Con gran cariño quiero acordarme de mis compañeras “aries” españolas, María y Noelia, con quienes cubríamos toda la geografía española, María la gaditana, Noelia la gallega y yo, la “close to Madrid”. Por las risas y el hermanamiento que tuvimos debido a nuestros problemas idiomáticos. Acordarme también de toda la gente de multitud de países que conocí en la facultad de Food Biosciences, que fueron más que compañeros: Valeria, Sandra, Cid, Laura, Khairul, Nasser, Ali, Gurjot, Christina, Barbara, Choni, Agustín, Virtú, Fisseha, Holly, Marianne y Alice.

No puedo olvidarme de la Dra. Carmen Bartolomé y su inestimable ayuda con la botánica. Ni de la Dra. Cristina Pardo y Antonio Ciruelos por la resolución de dudas surgidas en Melisopalinología y estadística.

A la artista Mamen por la portada de la tesis. A mi amiga del alma, Laura, por la ayuda prestada en Inglaterra. Y a ella y a Mónica, por ayudarme con el inglés.

Y por último, gracias a mis padres por estar siempre conmigo. A mi hermana por sus consejos y consuelo. Y a Jaime, por aguantarme todo este tiempo, porque casi nos cuesta el divorcio. Gracias por ser mi compañero, consejero y amigo. Y a mi niña, Valeria, la alegría de la casa, a la que por fin podré dedicarle el tiempo que necesita.

A mis padres

A Jaime y a mi pequeña Valeria

*"Casi todo lo que realice será insignificante, pero es
muy importante que lo haga."*

Mahatma Gandhi

Summary

The professional level of the beekeeping sector and quality control that the honey must pass prior to marketing are increasing. Even so, considering that the botanical origin and geographical area of production are important factors in the composition of honey, the knowledge of the properties and nutritional value of this food is still scarce.

The aim of this research is to determine the characteristics and certain minority components, with a high nutritional value and importance for health, of honey produced in the Spanish region of Castilla-La Mancha, one of its areas, "La Alcarria", being well known for its rosemary and lavender honeys, with Protected Denomination of Origin (PDO). This will allow answering the new requirements imposed by the food industry and consumers in improving quality control and labelling.

Until now, except for honey in the area of "La Alcarria", the rest of the beekeeping production in the region of Castilla-La Mancha has barely been studied. In order to have a greater knowledge of the honey produced in this region, a study on botanical identification, physico-chemical, nutritional and therapeutic properties of various monofloral honeys produced in this region has been performed, selecting those most representative and with continuous production.

First, the physico-chemical, palynological and sensorial characteristics of each of the selected monofloral honeys are described. These characteristics are specific to each variety of honey and, in many cases, also of the production zone. Honey types studied, not described to date, are chestnut produced in "Sierra de San Vicente" (Toledo), echium of Toledo and Ciudad Real, oak honeydew from Guadalajara, and thyme honey from the area of "La Alcarria" (Guadalajara), not included in the PDO. Likewise, data of the characteristics of each monofloral honey produced in the area of "La Alcarria" with PDO, rosemary and lavender, are provided. It is important to remark

Summary

that the specification of the PDO only shows the overall limits of the quality parameters estimated for packing any type of honeys commercialized under this indication of quality. With individualized data provided in this research work, the particular characteristics of rosemary and lavender honeys are better defined, specifying further quality.

The analysis of physico-chemical parameters, pH, electrical conductivity, HMF, humidity, free acidity and colour, have been made using the methods established by the International Commission of Honey (IHC). The major sugars, fructose, sucrose and glucose, have been analyzed by a chromatographic method with the procedure used in the Laboratory of Honey of “Centro Agrario de Marchamalo” (Guadalajara).

With the aim of studying the nutritional properties of honey from the region of Castilla-La Mancha, the amounts of several water-soluble vitamins, ascorbic acid (vitamin C) and various vitamins of B group, thiamine (vitamin B₁), riboflavin (vitamin B₂), niacin (vitamin B₃H), nicotinamide (vitamin B₃N), pantothenic acid (vitamin B₅) and pyridoxine (vitamin B₆), have been determined.

The concentration of vitamin C has been determined by a reverse phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC method, in isocratic mode with a mobile phase of 0.05% H₂SO₄/water at pH = 2.5. The accuracy of the method was carried out by comparison with those obtained by an AOAC official volumetric method. It has been observed that all honeys studied contain vitamin C, and it should be noted the high content found in thyme honey much higher than in the rest of honeys studied, indicating that this chemical compound can be considered as a chemical marker of this variety of honey. In addition, a stability study of the vitamin C was carried out in honey with different storage temperatures during one year. This compound is stable in the product at freezing (-18⁰C) and refrigeration (4⁰C). At room temperature, the vitamin C content decreases about 73% of its original content.

Using a linear discriminant analysis, LDA, the data obtained from the physico-chemical parameters, major sugars and vitamin C, have differentiated a 78% of the various honey samples according to their botanical origin, with only four control parameters: electrical conductivity, fructose, glucose and vitamin C.

For the analysis of water-soluble B vitamins, two reverse phase HPLC methods in isocratic mode have been developed, one of them using a conventional hydro-organic mobile phase and another one using a mobile phase, which contains a surfactant. The vitamins detection has been carried out with two detectors: ultraviolet (UV) and fluorescence (FL). The use of both detectors is useful because the riboflavin (vitamin B₂) and pyridoxine (vitamin B₆) vitamins have native fluorescence, which provides greater selectivity and sensitivity to the analysis. The rest of vitamins, thiamine (vitamin B₁), nicotinic acid (vitamin B₃H), nicotinamide (vitamin B₃N), and pantothenic acid (vitamin B₅) have been determined with UV detection.

One of the developed methods is based in the use of a mobile binary phase H₂SO₄ 0,01%/methanol 2% in water (pH=3.5) and a temperature of 25°C, achieving the separation of thiamine, nicotinic acid, nicotinamide, pantothenic acid and pyridoxine vitamins. Vitamin B₂ not is eluted with this mobile phase. Due to this reason, a second method has been developed in which a surfactant is added to the previous mobile phase. A cationic surfactant, hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) and another non ionic, polyoxyethylene-(23)-lauryl ether (Brij 35) have been tested and the surfactant concentration has been modified above and below its critical micellar concentration, with different organic modifiers in different proportions (methanol, ethanol, *n*-propanol and *n*-butanol). The separation has been carried out with a mobile phase H₂SO₄ 0.01%/CTAB 0.01M/methanol 2%, to pH=2.75 and a temperature of 25°C.

Finally, five honeys of each botanical type have been analyzed. In most of the honey samples nicotinic acid (vitamin B₃H) and nicotinamide (vitamin B₃N) were found. Vitamin B₁ was quantified in most of the samples except in the rosemary honeys. Vitamin B₂ has been detected in the chestnut honey and honeydew, concurring with the fact that they are the darkest honeys. Vitamin B₅ has been detected in very few samples. With regards to vitamin B₆, it was detected in more than half of the analyzed samples, but the concentration in which it appeared was so low that it was not possible to quantify it.

The functional properties of the honeys, antioxidant and antibacterial activity have been evaluated. Although both of them are well known and widely studied, their determination is interesting due to the variability of this property with the botanical

Summary

and geographic origin. Another therapeutic property, barely studied in honeys, the antihypertensive activity, was also studied.

It is known that many types of honey have levels of antioxidants similar to fruit and vegetables. In order to evaluate the levels of antioxidants parameters in the honeys, antioxidant activity obtained by DPPH method and the concentration of total polyphenols, in addition to previously mentioned vitamin C, have been analyzed. Remarkable levels of antioxidant activity were obtained in the honeys of thyme, due fundamentally to their high concentration in vitamin C, although it is also important its high content in total polyphenols. Chestnut honey has special importance for its high antioxidant activity, due to the high content of total polyphenols. For the rest of honeys, the levels of antioxidant activity obtained have lower values.

The antibacterial activity was evaluated by means of a method of agar in plate with a gram-positive bacterium, *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC and another gram-negative, *Escherichia coli* ATCC 25922. Although the sensitivity of both bacteria against the different honeys is not equal, chestnut honey is always the one of greater potential, while the rest barely presents any antibacterial effect. It only appears complete inhibition of the bacterial growth with the chestnut honeys. Although hydrogen peroxide is the main bactericidal agent present in honey, the study was extended, carrying out a test with catalase, enzyme that H_2O_2 degrades, with the purpose of knowing another component to attribute it the greater bactericidal effect of the chestnut honey. Against *E. coli* the antibacterial activity disappears, which means that this activity is only due to H_2O_2 . However, versus *S. aureus* the disappearance is not complete. Something more exists aside from H_2O_2 , that it inhibits the growth of *S. aureus*. When the concentration of the lysozyme enzyme in all the types of honeys is measured, it is observed that the chestnut honeys contain ten times more enzyme than the rest of honeys, partly explaining the greater antibacterial activity of this honey.

In order to finalize the study of functional properties of these monofloral honeys of “Castilla-La Mancha”, an *in vitro* study of the antihypertensive activity was made. For this study, the inhibition activity of the Angiotensin I-converting enzyme (ACE) was evaluated. This is the first time that this property is investigated in several

honey types. The obtained results have been positive: all the analyzed samples presented inhibition of the enzyme, being greater than 50% in the most of the chestnut honeys. The IC_{50} of this enzyme, for the honey of greater antihypertensive activity, has been determined giving a high value (80 mg of honey/mL). Comparing to other products of recognized antihypertensive activity, these values indicate that it is not a powerful inhibitor of the ACE, nonetheless, discovering that the honey has intrinsic antihypertensive activity is an outstanding fact.

Índice

ACRÓNIMOS	A1
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES	
1. LA MIEL	1
1.1. Definición	1
1.2.Composición de la miel	2
1.2.1. <i>Composición química</i>	2
1.2.2. <i>Flora microbiana</i>	13
1.2.3. <i>Otros componentes</i>	14
1.3.Propiedades funcionales de la miel	15
2. LA CALIDAD DE LA MIEL	18
2.1.Parámetros físico-químicos de calidad	21
2.1.1. <i>Azúcares</i>	21
2.1.2. <i>Humedad</i>	21
2.1.3. <i>Sólidos insolubles</i>	22
2.1.4. <i>Acidez y pH</i>	22
2.1.5. <i>Conductividad eléctrica</i>	23
2.1.6. <i>Color</i>	24
2.2.Índices de frescura	28
2.2.1. <i>Hidroximetilfurfural (HMF)</i>	28
2.2.2. <i>Actividad diastásica</i>	28
3. IDENTIFICACIÓN DEL TIPO DE MIEL. LA CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA Y GEOGRÁFICA DE MIELES	29
3.1.Melisopalinología	30
3.2.Análisis sensorial	33
3.3.Otras técnicas de identificación	35
4. OBJETIVOS GENERALES	36

CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE MIELES MONOFLORALES PRODUCIDAS EN CASTILLA-LA MANCHA

1. INTRODUCCIÓN	39
1.1. El sector de la miel en España y en Castilla-La Mancha	39
1.2. La caracterización botánica y geográfica de mieles producidas en Castilla-La Mancha	45
1.2.1. <i>Antecedentes de la caracterización botánica y geográfica de mieles</i>	46
1.2.2. <i>Mieles monoflorales producidas en Castilla-La Mancha. Justificación de la elección de las mieles monoflorales estudiadas</i>	49
1.2.3. <i>Plantas responsables de las distintas producciones de miel de Castilla-La Mancha</i>	53
1.2.4. <i>Zonas geográficas de interés apícola castellano manchegas</i>	58
1.2.4.1. <i>LA SIERRA DE SAN VICENTE</i>	58
1.2.4.2. <i>LA ALCARRIA</i>	61
1.2.4.2.1. <i><u>MIEL DE LA ALCARRIA</u></i>	66
2. OBJETIVOS	68
3. MATERIAL Y MÉTODOS	68
3.1. Muestras de miel	68
3.2. Parámetros físico-químicos de calidad	72
3.2.1. <i>Hidroximetilfurfural</i>	73
3.2.2. <i>Humedad</i>	74
3.2.3. <i>Acidez libre y pH</i>	75
3.2.4. <i>Conductividad eléctrica</i>	77
3.3. Colorimetría	77
3.3.1. <i>Método colorimétrico CIELAB</i>	77
3.3.2. <i>Método colorimétrico PFUND</i>	79
3.4. Melisopalinología	81
3.5. Análisis sensorial	83
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
4.1. Parámetros físico-químicos de calidad	86
4.1.1. <i>Parámetro de frescura: HMF</i>	87
4.1.2. <i>Humedad</i>	90

4.1.3. Acidez libre y pH	93
4.1.4. Conductividad eléctrica	104
4.2. Discriminación de las mieles por su origen botánico, parte A	106
4.2.1. Análisis de componentes principales, PCA	109
4.2.2. Análisis discriminante lineal, LDA	114
4.3. Color	116
4.3.1. Colorimetría CIELAB	117
4.3.2. Colorimetría PFUND	123
4.4. Discriminación de las mieles por su origen botánico, parte B	127
4.4.1. Análisis de componentes principales, PCA	127
4.4.2. Análisis discriminante lineal, LDA	131
4.5. Perfiles palinológicos de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha	133
4.6. Perfiles sensoriales de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha	152
5. CONCLUSIONES Y FICHAS RESUMEN	165

CAPÍTULO III. VITAMINA C Y AZÚCARES COMO MARCADORES SIMPLES PARA LA DISCRIMINACIÓN DE MIELES

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	173
2. OBJETIVOS	178
3. MATERIAL Y MÉTODOS	178
3.1. Reactivos y patrones	178
3.2. Muestras de miel	179
3.3. Instrumentación	179
3.4. Procedimiento	179
3.4.1. Determinación de ácido ascórbico o vitamina C	179
3.4.1.1. Cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa, RP-HPLC	179
3.4.1.2. Volumetría redox con el reactivo 2,6-diclorofenol-indofenol	180
3.4.2. Determinación de fructosa y glucosa por cromatografía líquida de alta eficacia	180
3.5. Tratamiento estadístico	181

Índice

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	181
4.1. Determinación de ácido ascórbico o vitamina C	181
4.1.1. <i>Análisis de vitamina C por RP-HPLC</i>	181
4.1.2. <i>Contenido de vitamina C en los diferentes tipos de miel de Castilla-La Mancha por RP-HPLC</i>	182
4.1.3. <i>Análisis de vitamina C por volumetría redox con el reactivo 2,6-diclorofenol indofenol</i>	186
4.1.4. <i>Estudio de estabilidad de vitamina C en miel almacenada a diferentes temperaturas</i>	188
4.2. Azúcares mayoritarios	190
4.3. Discriminación de las mieles por su origen botánico, parte C	193
4.3.1. <i>Análisis de componentes principales, PCA</i>	193
4.3.2. <i>Análisis discriminante lineal</i>	196
5. CONCLUSIONES	199

CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN DE VITAMINAS DEL GRUPO B EN MIELES POR RP-HPLC EN MODO ISOCRÁTICO

1. INTRODUCCIÓN	201
1.1. Métodos cromatográficos para la determinación de vitaminas hidrosolubles del grupo B	204
1.1.1. <i>Métodos cromatográficos en ausencia de tensioactivos en la fase móvil</i>	204
1.1.2. <i>Métodos cromatográficos en presencia de tensioactivos en la fase móvil</i>	221
1.2. Métodos cromatográficos para la determinación de vitaminas hidrosolubles del grupo B en mieles	225
1.3. Propiedades nutritivas de la miel	228
2. OBJETIVOS	232
3. MATERIAL Y MÉTODOS	232
3.1. Reactivos y disoluciones	232
3.2. Muestras de miel	233
3.3. Instrumentación	233

3.4.Procedimiento	234
3.4.1. <i>Optimización de la fase móvil</i>	234
3.4.2. <i>Características analíticas de los métodos cromatográficos</i>	235
3.4.3. <i>Análisis de las vitaminas en las muestras de miel</i>	235
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	235
4.1. Influencia del pH, la temperatura y la adición de un alcohol de cadena corta a la fase móvil en la separación cromatográfica de las vitaminas hidrosolubles con una fase móvil H₂SO₄ 0.01% (v/v).	236
4.1.1. <i>Influencia del pH</i>	236
4.1.2. <i>Influencia de la temperatura</i>	237
4.1.3. <i>Influencia de la adición de un alcohol de cadena corta a la fase móvil</i>	238
4.2. Influencia de la adición de tensioactivos a la fase móvil en la separación cromatográfica de vitaminas hidrosolubles	242
4.3. Características analíticas del métodos cromatográfico con una fase móvil H₂SO₄ 0.01%/MeOH 2%/pH 3.5/25°C	246
4.4. Características analíticas del métodos cromatográfico con una fase móvil CTAB 0.01M/ H₂SO₄ 0.01%/MeOH 2%/pH 3.5/25°C	247
4.5. Determinación de vitaminas hidrosolubles del grupo B en mieles por RP-HPLC en ausencia y en presencia de CTAB en la fase móvil	249
5. CONCLUSIONES	258
 CAPÍTULO V. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS MIELES DE CASTILLA-LA MANCHA: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA Y ANTIHIPERTENSIVA	
1. INTRODUCCIÓN	261
1.1. Actividad antioxidante de la miel	262
1.2. Actividad antimicrobiana de la miel	265
1.3. Actividad antihipertensiva de la miel	268
2. OBJETIVOS	270
3. MATERIAL Y MÉTODOS	271
3.1. Muestras de miel	271
3.2. Análisis de componentes antioxidantes	271
3.3. Actividad antibacteriana	272
3.3.1. <i>Determinación cualitativa de la actividad antibacteriana</i>	272

Índice

3.3.2. <i>Determinación de la actividad antibacteriana en presencia de catalasa</i>	273
3.3.3. <i>Determinación cuantitativa de la actividad Antimicrobiana</i>	273
3.3.4. <i>Determinación de lisozima</i>	274
3.4. Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA <i>in vitro</i>	275
3.5. Análisis estadístico	275
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	275
4.1. Actividad antioxidante	275
4.1.1. <i>Correlación entre la actividad antioxidante y las concentraciones de polifenoles totales y vitaminaC. Regresión múltiple</i>	278
4.2. Discriminación de las mieles por su origen botánico, parte D. Análisis lineal discriminante, LDA	280
4.3. Actividad antibacteriana	282
4.3.1. <i>Actividad antibacteriana frente a E. coli</i>	283
4.3.2. <i>Actividad antibacteriana frente a S. aureus</i>	285
4.3.3. <i>Estudios de la actividad antibacteriana no-peróxido</i>	287
4.3.4. <i>Cálculo de la actividad antibacteriana de las mieles de Castilla La Mancha</i>	290
4.4. Actividad antihipertensiva	292
5. CONCLUSIONES	296
 CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES FINALES	 299
 CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA	 303

Acrónimos

a*	Cromaticidad rojo/verde
%AAE	Porcentaje equivalente de ácido ascórbico
ABTS	Ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico)
ACN	Acetonitrilo
AH	Ácido hipúrico
ANOVA	Análisis de la varianza
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APLE	Asociación de Palinólogos de Lengua Española
b*	Cromaticidad amarillo/azul
BCA	Ensayo del ácido bicinconínico (ácido 2-(4-carboxiquinolin-2-il)-quinolina-4-carboxílico)
BOE	Boletín Oficial del Estado
BSA	Sero albúmina bovina
<i>n</i> -BuOH o BuOH	<i>n</i> -butanol
C*ab	Croma
CA	Análisis cluster
CDR	Cantidad Diaria Recomendada
CE	Comunidad Europea
CIE	<i>Commission Internationale de l'Eclairage</i>
CLM	Castilla-La Mancha
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DAD	Detector de Diodos en serie
D/H	Deuterio/Hidrógeno
DCPI	2,6-diclorofenolindofenol
DMPD	Diclorhidrato de N,N-dimetilfenilendiamina
DOP	Denominación de Origen Protegida
DOUE	Diario Oficial de la Unión Europea
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ETAAS	Espectroscopia de absorción con atomizadores electrotérmicos
EtOH	Etanol
FAAS	Espectroscopia de absorción atómica con llama
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FL	Fluorescencia

Acrónimos

FRAP	Poder Antioxidante de Reducción Férrica
GAE	Ácido gálico equivalente
h*	Ángulo de tono
HDE	Elementos de mielada (<i>Honeydew elements</i>)
HHL	N-hipuril-L-histidil-L-leucina
HL	His-Leu
HMF	Hidroximetilfurfural (5-(hidroximetil)-2-furancarboxilaldehído)
HPAEC-PAD	Cromatografía de intercambio iónico con detección amperométrica pulsada
RP-HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa
IC ₅₀	Concentración de miel que produce una inhibición del 50% de la actividad de la enzima
ICP-MS	Plasma de inducción acoplado a espectrometría de masas
ICP-OES	Plasma de inducción acoplado a espectroscopia de emisión óptica
IECA	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina
IGP	Indicación Geográfica Protegida
IHC	Comisión Internacional de la Miel
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
JCCM	Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha
L*	Claridad o luminosidad
LD	Límite de detección
LDA	Análisis Discriminante Lineal
LQ	Límite de cuantificación
MEKC	Cromatografía Electrocinética Micelar
MeOH	Metanol
MLC	Cromatografía Líquida Micelar
ORAC	Capacidad de absorber radicales oxígeno
PCA	Análisis de Componentes Principales
n-PeOH o PeOH	n-pentanol
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido débil
PL	Piridoxal
PM	Piridoxamina
PN	Piridoxina
PT	Polifenoles totales
n-PrOH o PrOH	n-propanol
RSD	Desviación estándar relativa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
t	Tonelada métrica
TCA	Ácido tricloroacético

TEAC	Capacidad antioxidante equivalente de Trolox
TFA	Ácido trifluoracético
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetremetilcroman-2-carboxílico
UMF	Factor Único de Manuka
UV	Ultravioleta

CAPÍTULO I:

Introducción y objetivos generales

1. LA MIEL

1.1. Definición

“La miel es la sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure”. Esta es la definición que viene recogida en la Norma española de calidad relativa a la miel [BOE nº186 de 5 de Agosto de 2003], la cual fija las condiciones y características que debe cumplir el producto para su presentación, comercialización y consumo en el mercado español. Pero la miel es algo más que una fría definición, la miel es un alimento que los seres humanos conocen y consumen desde hace unos doscientos mil años, lo que le ha convertido en un alimento mítico al cual se le atribuyen toda clase de virtudes curativas y nutritivas [Prior Canales, 1989]. Actualmente, con el auge de los alimentos biológicos, la miel experimenta nuevamente una gran reputación como producto natural y saludable

Las principales variedades de miel según su materia prima de origen son [BOE nº186 de 5 de agosto de 2003]:

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

a. **Miel de flores o miel de néctar:** es la miel que procede del néctar de las plantas. Se clasifica como:

- Multifloral (o milflores): aquellas que proceden de una flora variada, no habiendo una contribución floral predominante, lo cual hace difícil identificar su procedencia exacta.
- Monofloral: son las mieles que provienen mayoritariamente de una especie vegetal determinada y poseen, por tanto, características organolépticas, físico-químicas y palinológicas específicas, pudiéndolas definir de una manera bastante precisa.

b. **Miel de mielada, mielato o miel de bosque:** es la miel que procede en su mayor parte de excreciones de insectos chupadores de plantas (hemípteros) o de secreciones de las partes vivas de las plantas. La mielada tiene composición glucídica más compleja que el néctar. Tiene un menor contenido en glucosa y fructosa y un mayor número de oligosacáridos, entre los cuales destacan los trisacáridos melezitosa y rafinosa.

La abeja normalmente tiende a recolectar néctar floral. Solamente en años climatológicos adversos, ante la mayor escasez de néctar, recogerá mielada para obtener mielato. Pero hay que tener en cuenta que el mielato no siempre estará disponible, ya que su producción no es constante. Además de depender de la climatología, su producción también dependerá de la dinámica de población de estos insectos y de la planta huésped.

1.2. Composición de la miel

1.2.1. Composición química

Al ser un producto natural, la composición de la miel va a ser compleja y diversa, así no deberíamos hablar de miel, sino de mieles, como se habla de vinos o quesos [Prior Canales, 1989]. La composición y las propiedades de la miel están muy relacionadas con el tipo de plantas pecoreadas, es decir, con el origen botánico; pero también son determinantes, sobre todo en cuanto a la calidad de la miel se refiere, el modo de obtención (centrifugación, prensado, en panal), la temporada de recogida,

las condiciones climatológicas, la maduración de la miel y el origen geográfico. Todo esto influye de manera sustancial en el producto final.

La miel aporta unas 64 calorías por cucharada (21 g), lo que hace que este producto sea la fuente más concentrada de energía de entre todos los edulcorantes habituales [The National Honey Board, 2002]. En la tabla I.1 se resume una estimación de la composición nutricional de la miel por 100 g, pero hay que tener en cuenta que estos valores son orientativos y pueden variar considerablemente en función del origen botánico y geográfico de la miel.

Tabla I.1. Composición nutricional de la miel [Arvanitoyannis et al., 2005; White et al., 1962; USDA, Natural Nutrient Database].

Nutriente	Cantidad media en cada 100 g de miel
AGUA	17.1 g
HIDRATOS DE CARBONO	82.2 g
Fructosa	38.2 g
Glucosa	31.3 g
Maltosa	7.3 g
Sacarosa	1.3 g
Otros	4.3 g
PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS	0.5 g
LÍPIDOS	0.0 g
MINERALES	0.2 g
Sodio	9.3 mg
Calcio	4.8 mg
Zinc	0.15 mg

Tabla I.1. (continuación)

Nutriente	Cantidad media en cada 100 g de miel
Potasio	50.0 mg
Fósforo	5.0 mg
Magnesio	2.0 mg
Manganeso	0.15 mg
VITAMINAS	
Tiamina (B ₁)	< 0.01 mg
Riboflavina (B ₂)	< 0.3 mg
Niacina (B ₃)	< 0.3 mg
Ácido pantoténico (B ₅)	< 0.25 mg
Piridoxina (B ₆)	< 0.002 mg
Ácido ascórbico (C)	0.5 mg

La miel contiene del orden de 200 compuestos diferentes. Además de los constituyentes mayoritarios que la componen (azúcares, agua, proteínas, aminoácidos, y minerales), hay un conjunto de sustancias que aparecen en pequeñas cantidades, de naturaleza muy diversa, que pueden aportarles carácter propio; entre ellos se encuentran de forma habitual: ácidos orgánicos (ácido glucónico, ácido acético, ácido butírico, ácido láctico, ácido oxálico), enzimas (amilasa, sacarasa, glucosa oxidasa, catalasa, fosfatasa ácida), lípidos (ácido palmítico, ácido oleico), vitaminas y polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y derivados de los ácidos fenólicos) [Bogdanov et al., 2008].

Se desglosan a continuación los principales componentes de la miel:

➤ **AGUA**

El contenido en agua de una miel está relacionado con factores como la humedad ambiental y edáfica, la flora y la abundancia de la fuente de néctar, así como con el manejo apícola y el momento de extracción adecuado. También, dependiendo de cuál sea la estación del año de cosecha y las condiciones climatológicas, las mieles pueden mostrar diferencias típicas en su humedad. Esto puede afectar a las propiedades físicas de esa miel (viscosidad y cristalización) y a la relación glucosa/agua.

Cuando la miel depositada en las celdillas de la colmena alcanza la humedad adecuada para su óptima conservación, las abejas operculan (o cierran a base de cera) totalmente dichas celdillas, de manera que esa humedad no varíe. El intervalo de humedad “adecuada” puede variar mucho dependiendo de la zona geográfica donde nos encontremos, pudiendo darse valores del 13% al 25%. En zonas tropicales, a causa de la alta humedad atmosférica, el porcentaje puede ser incluso mayor, debido a la incapacidad física de la abeja para reducir el contenido en agua de la miel [Ortiz Valbuena et al., 1996].

➤ **AZÚCARES**

Desde el punto de vista químico, los azúcares son carbohidratos con una fórmula empírica general del tipo $C_n(H_2O)_n$ o $C_n(H_2O)_{n-x}$. Los carbohidratos se han clasificado tradicionalmente, según su peso molecular, en azúcares sencillos (monosacáridos, disacáridos, trisacáridos y oligosacáridos), que se caracterizan por ser dulces y solubles; y en polisacáridos (azúcares complejos de mayor tamaño) que ganan en viscosidad y pierden, a su vez, en dulzor y solubilidad, como por ejemplo el almidón [De Lorenzo, 2002].

Los carbohidratos, concretamente del tipo azúcares sencillos, son los componentes mayoritarios de la miel. Suponen en torno a un 95% del peso seco,

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

siendo responsables de su elevado poder calórico y del sabor dulce. Otras propiedades físicas que los azúcares confieren a la miel son: granulación, higroscopicidad y alta osmolaridad.

Los azúcares más abundantes en la miel son D-fructosa y D-glucosa. Ellos solos constituyen aproximadamente el 80% de la composición del producto. La proporción entre ambos azúcares depende del origen floral, pero habitualmente la concentración de fructosa predomina sobre la de glucosa. El azúcar que proporciona el sabor dulce a la miel es la fructosa principalmente, y en menor medida la glucosa. Así, generalmente una miel con alto contenido en fructosa, como es el caso de la miel de acacia, es más dulce que aquella con alto contenido en glucosa, como es la miel de colza [Bogdanov et al., 2008].

El resto de azúcares, entre un 5 y un 15%, son polisacáridos. Se han detectado hasta 25 diferentes di-, tri- y tetra-sacáridos [Ruiz Matute, 2007; Bogdanov et al., 2008].

Entre los disacáridos más comunes aparece maltosa, que está constituido por dos moléculas de D-glucosa; y en menor proporción se encuentra sacarosa, que está formada por una molécula de D-glucosa y otra de D-fructosa [Ortiz Valbuena et al., 1996].

Entre los tri- y oligosacáridos que se encuentran con más asiduidad en la miel, aunque son cuantitativamente poco importantes en la composición total de azúcares, están: melezitosa, rafinosa, erlosa, maltotriosa, panosa o isomaltotetrosa [Ruiz Matute, 2007].

El estado de maduración de la miel y las condiciones de almacenamiento determinan la aparición y las proporciones de azúcares que contiene, empobreciéndose al envejecer en monosacáridos, mientras que se enriquece en polisacáridos [Sáenz Lain & Gómez Ferreras, 2000].

Existen considerables diferencias en la composición de azúcares entre la miel de néctar de flores y la miel de mielada o mielato. Esta última es menos dulce, debido a su menor contenido en fructosa y glucosa, presentando a su vez gran cantidad de

oligosacáridos, entre los que se encuentran los trisacáridos melezitosa y rafinosa, ausentes ambos en las mieles provenientes de néctar de flores [Donner, 1977].

La composición glucídica ha sido determinada con diferentes técnicas analíticas basadas en sus características físicas y químicas, o mediante métodos enzimáticos. Durante mucho tiempo se ha utilizado el método de Fehling, que mide los azúcares reductores aparentes y la sacarosa aparente. Los azúcares reductores aparentes corresponden a la suma de los azúcares principales: glucosa y fructosa, junto con algunos disacáridos reductores con grupo aldehído libre, principalmente maltosa. La valoración de sacarosa aparente, determina los azúcares que no se reducen con el cobre de la reacción. La diferencia entre la determinación de azúcares reductores antes y después de la hidrólisis, es por consiguiente una medida de los oligosacáridos no reductores. La sacarosa se encuentra en cantidades muy superiores a las del resto de azúcares no reducidos, de esto viene la denominación de “sacarosa aparente” donde se engloba a este grupo de carbohidratos. Este método, que ha sido utilizado durante al menos 100 años, se ha ido poco a poco reemplazado por otras técnicas más precisas y rápidas como son las cromatográficas, cuya ventaja es que separan e identifican cada sacárido individualmente, no hacen un cómputo global como ocurre con el método de Fehling.

La cromatografía líquida de alta eficacia con detector de índice de refracción se ha utilizado ampliamente para la determinación cuantitativa de carbohidratos en alimentos, debido a que es una técnica sencilla y rápida, que no requiere derivatización de la muestra previamente al análisis, proporcionando suficiente resolución para los azúcares más comunes en miel (fructosa, glucosa y sacarosa). Los métodos desarrollados para este tipo de cromatografía en mieles presentan problemas comunes, como es el hecho de que los materiales de relleno que se utilizan en las columnas, de tipo amino o de intercambio iónico habitualmente, pueden reaccionar con compuestos de la matriz de la miel, reduciendo la vida útil de las columnas. El uso de derivados pre- o post-columna aumenta la sensibilidad y robustez de la técnica, además de la vida útil de las columnas cromatográficas. La sensibilidad y selectividad de la detección de carbohidratos minoritarios es baja, por lo que para estos compuestos esta técnica no es muy útil [Ruiz Matute, 2007].

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

Otras técnicas cromatográficas que también se han utilizado para este cometido son: la cromatografía en placa, la cromatografía de intercambio iónico con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) y la cromatografía de gases con detección FID. Estos métodos están descritos y validados por la Comisión Internacional de la Miel (IHC) [Bogdanov et al., 1999]. Cualquiera de ellos es muy útil para comparar los azúcares mayoritarios (glucosa, fructosa y sacarosa). Por el contrario, para la determinación de los azúcares minoritarios (maltosa, maltotriosa, melezitosa, etc.) la metodología empleada influye mucho en el resultado, ya que no se logra el mismo nivel de separación y sensibilidad según que técnica se utilice [Bogdanov et al., 2004].

➤ PROTEÍNAS, AMINOÁCIDOS Y ENZIMAS

La miel contiene en torno al 0.5% de componentes proteicos, principalmente en forma de enzimas y aminoácidos libres. Su origen puede estar tanto en la abeja (enzimas) como en el vegetal (aminoácidos libres y otras proteínas) [Bogdanov et al., 2008]. Las mieles que provengan de plantas con mucha cantidad de polen tendrán mayor porcentaje proteico, como ocurre en las mieles de castaño o viborera, ya que el polen de las plantas está compuesto principalmente por proteínas.

La cantidad total de aminoácidos libres en miel está comprendida entre 10 y 200 mg/100 g. Solamente el aminoácido prolina representa un 50% de estos compuestos. Este aminoácido se usa como índice de calidad referido a la maduración de la miel y de posibles adulteraciones, de esta forma si la miel ha sido recogida inmadura o si las abejas han sido alimentadas con azúcar comercial, el contenido en prolina será anormalmente bajo [White & Rudyj, 1978]. Además de prolina, se han encontrado 26 aminoácidos libres más en este alimento, cuyas proporciones dependerán del origen composicional (néctar o mielato). Los más frecuentes suelen ser lisina, fenilalanina, tirosina, ácido glutámico y ácido aspártico. Los aminoácidos, junto con los alcoholes, ésteres, aldehídos y ácidos, son determinantes en las propiedades organolépticas de la miel, contribuyendo a su aroma característico [Ortiz Valbuena et al., 1996]. Por otro lado, ya que el polen es la mayor fuente de aminoácidos en la miel, el perfil aminoacídico podría ser característico de su origen botánico e incluso geográfico. Aunque según Bogdanov et al. [2004], es difícil diferenciar entre mieles de distintos orígenes botánicos en base a su composición en aminoácidos libres, otros autores han

obtenido buenos resultados al discriminar en cuanto a origen geográfico [Cometto et al., 2003; Iglesias et al., 2004; Senyuva et al., 2009].

Otros componentes nitrogenados que se hallan en la miel son las enzimas, que juegan un papel esencial en la transformación del néctar en miel. Proviene de los jugos salivares y secreciones faríngeas de la abeja obrera. Las tres enzimas más importantes de la miel son: diastasa (o α -amilasa), que descompone el almidón (que no es muy frecuente en néctar, aunque es la sustancia de reserva más abundante del reino vegetal), oligo y polisacáridos relacionados, en pequeñas unidades de azúcares simples (dextrinas) [Ortiz Valbuena et al., 1996]; invertasa (también denominada sacarasa o α -glucosidasa), que descompone la sacarosa del néctar en monómeros de fructosa y glucosa, es la más importante en la transformación del néctar en miel; y glucosa oxidasa, que produce el peróxido de hidrógeno, factor clave en el efecto antibacteriano de la miel, al transformar glucosa en ácido glucónico. También se produce gluconolactona en equilibrio con el ácido glucónico. En menor cantidad aparece catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno [The National Honey Board, 2002]. Son utilizadas como indicadores de calidad por su labilidad, ya que su reducción o ausencia se pueden relacionar con alteraciones que haya sufrido el producto como por ejemplo un calentamiento excesivo, adulteración o envejecimiento de la miel [Ortiz Valbuena, 1992].

Las proteínas son cuantificadas mediante métodos espectrofotométricos por formación de complejos coloreados, los más habituales son el método Lowry, Bradford y BCA. En todos ellos utilizan sero albúmina bovina (BSA) como patrón de referencia. En cambio, el método Kjeldahl, muy aplicado en la cuantificación proteica de alimentos, no sería el método más adecuado en mieles porque para aplicarlo, las proteínas deberían ser los componentes nitrogenados mayoritarios del alimento. Esto no ocurre en la miel, como se comentó el contenido proteico esta en torno a un 0.5% y además este producto contiene una matriz azucarada que podría interferir en la digestión de la muestra por cristalización de dichos azúcares, dando lugar a un error cuantitativo importante [De Lorenzo, 2002].

Los aminoácidos libres se suelen determinar por cromatografía líquida y con menor frecuencia, por cromatografía de gases [Bogdanov et al., 2004].

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

➤ LÍPIDOS

Aunque prácticamente inexistentes, se han separado en cantidades traza: glicéridos, esteroides, fosfolípidos, los ácidos palmítico, oleico, láurico, miristoleico, esteárico y linoleico [Sáenz Lain & Gómez Ferreras, 2000].

➤ MINERALES

Teniendo en cuenta que los contenidos minerales pueden ser fácilmente contaminados por el ambiente, el manejo del apicultor o las condiciones del suelo, de forma general se considera que la presencia de elementos minerales en la miel es bajo y muy variable, en torno a un 0.2% en mieles de origen floral y de un 1% en mieles de mielato. El elemento más abundante es el potasio que representa hasta un 80% de la materia mineral total. Otros elementos habitualmente encontrados son: Ca, Na, Fe, P, Mg, Zn, Cu y Mn [De Lorenzo, 2002].

Según algunos investigadores, no se ha podido observar una tendencia clara que agrupe mieles del mismo origen floral según su contenido en minerales [Latorre et al., 1999; De Lorenzo, 2002]. Si se ha observado que las mieles oscuras, y particularmente los mielatos, son más ricos en elementos minerales [González-Paramás et al., 2000; González-Miret et al. 2005; Pohl et al., 2009]. Por el contrario, la zona geográfica donde se encuentre el material libado si se ha relacionado de manera positiva con el contenido mineral de la miel [Anklam, 1998].

También se ha utilizado la miel como biomarcador de contaminación ambiental mediante la determinación en ella de metales pesados, como el plomo y el cadmio [Leita et al., 1996; Przybyłowski & Wilczyńska, 2001].

La cantidad de cenizas era el parámetro tradicionalmente utilizado para medir el contenido en minerales del producto. Actualmente es la conductividad eléctrica de la miel disuelta en agua, el parámetro que se utiliza para evaluar el contenido mineral, debido a la rapidez, precisión y bajo coste de esta técnica [Acquarone et al., 2007].

Para la determinación individual de minerales, las técnicas más utilizadas han sido la espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS) y con atomizadores

electrotérmicos (ETAAS) y, más recientemente, la emisión de plasma de inducción con detección óptica (ICP-OES) o de masas (ICP-MS) [Pohl et al., 2009].

➤ VITAMINAS

El contenido en vitaminas de la miel es bajo en general, aunque como ya se comentó, la concentración de estos compuestos y como de otros elementos traza, varía mucho dependiendo del origen botánico de la miel [Bogdanov et al., 2008]. Como ejemplo podemos citar las mieles de menta de agua (*Mentha aquatica*) y tomillo (*Thymus*) que contienen una elevada concentración de vitamina C [Griebel et al., 1940; Ortiz Valbuena, 1992], mientras que en la mayoría de tipos de miel la concentración de este elemento esencial es muy baja o incluso no se detecta [Gheldof et al., 2002].

Las vitaminas más importantes y abundantes en miel son las de carácter hidrosoluble, debido a la matriz glucídica de este alimento; aunque también se han detectado las vitaminas liposolubles A, D y E, pero de manera más esporádica [Sáenz Lain & Gómez Ferreras, 2000]. Las vitaminas hidrosolubles que más se han descrito en la bibliografía especializada son el ácido ascórbico (vitamina C) y dentro del grupo vitamínico B: riboflavina (vitamina B₂), ácido nicotínico (vitamina B₃H), nicotinamida (vitamina B₃N), ácido pantoténico (vitamina B₅), piridoxina (vitamina B₆) y ácido fólico (vitamina B₉).

La determinación de vitaminas en alimentos supone habitualmente un reto debido a su inestabilidad. En el caso de la miel, se ha demostrado que el contenido vitamínico disminuye con la filtración al perder buena parte del residuo de polen. Otro factor que causa pérdida de vitaminas en la miel es la oxidación del ácido ascórbico por el peróxido de hidrógeno producido por la enzima glucosa oxidasa. Debido a los bajos niveles y la inestabilidad de estos compuestos, hay pocos trabajos de investigación publicados referentes a vitaminas en mieles [Matei et al., 2004; Viñas et al., 2004a y 2004b; Hayakawa et al., 2008; Ciulu et al., 2011; Krishna Kishorea et al., 2011; Da Silva et al., 2012; Viñas et al., 2012].

➤ ÁCIDOS

Los ácidos orgánicos presentes en la miel contribuyen a su sabor, aportando ligera acidez. Además proporcionan estabilidad al producto frente a la proliferación bacteriana. Se hallan como ácidos libres y también como lactonas. Cuando la miel se alcaliniza, las lactonas originan los ácidos correspondientes produciendo la consiguiente acidificación y constituyendo una reserva potencial de acidez. El ácido glucónico, formado a partir de la glucosa, es el más abundante, pero además la miel contiene otros muchos ácidos, que pueden ser de origen animal, como el ácido fórmico y el ácido oxálico, o de origen vegetal, como los ácidos succínico, málico, maleico, butírico, fórmico, cítrico, acético, etc [Sáenz Laín & Gómez Ferreras, 2000; Ortiz Valbuena, 1992].

➤ POLIFENOLES

Los polifenoles o compuestos fenólicos constituyen un grupo considerable de sustancias que pueden definirse, desde el punto de vista químico, como compuestos orgánicos presentes en la naturaleza, que poseen, al menos, un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos a él. Esos grupos funcionales pueden ser sustituidos por ésteres, metil-éster, glicósidos, etc. Desde el punto de vista biológico son englobados por su origen metabólico por ser metabolitos secundarios de la ruta del ácido shikímico y de los fenilpropanoides de las plantas. De esta forma han sido usados como marcadores quimiotaxonómicos en plantas. En mieles también se han utilizado como marcadores del origen botánico, ya que se han encontrado considerables diferencias entre mieles monoflorales, tanto en los tipos de polifenoles que aparecen, como en la concentración de estos [Bogdanov et al., 2004].

La abeja obtiene estos compuestos del néctar y los propóleos. Son principalmente flavonoides (quercetín, luteolín, kaempferol, apigenín, crisín y galangín), ácidos fenólicos y sus derivados. Solo flavonoides puros parecen estar presentes en mieles y propóleos, mientras que en el polen apícola aparecen flavonoides en forma de heterósido (unidos a un azúcar) [Anklam, 1998]. Aunque sus niveles en miel son muy bajos, contribuyen en gran medida a las propiedades antioxidantes del producto [Bogdanov et al., 2008]. Estos compuestos también son

responsables de la coloración de las mieles, apareciendo habitualmente mayor cantidad en las mieles oscuras [Estevinho et al., 2008; Ferreira et al., 2009].

Los métodos usados para el análisis de flavonoides son lentos debido a los diferentes pasos de purificación previos a la determinación por HPLC, que es la técnica más utilizada para su determinación [Anklam, 1998; Yao et al., 2004a y 2004b; Estevinho et al., 2008; Pichichero et al., 2009; Pyrzynska & Biesaga, 2009; Escriche et al., 2011]. Otros tipos de técnicas que han sido utilizadas para la determinación de estos compuestos son la electroforesis capilar [Andrade et al., 1997b; Arráez-Román et al., 2006; Herrero-Martínez et al., 2007] y la cromatografía de gases [Berahia et al., 1993].

1.2.2. Flora microbiana

En las mieles naturales, sin pasteurización, siempre existe una flora microbiológica propia. Recién cosechada es cuando mayor carga microbiológica posee, ya que se une la flora microbiológica del producto, junto con la aportada por la contaminación ambiental y el manejo del apicultor. A lo largo del tiempo la supervivencia y el crecimiento de estos microorganismos se verá limitado por los diferentes factores antimicrobianos inherentes a la miel: alta presión osmótica, pH ácido, humedad inferior al 20% y actividad de agua muy baja, elevada viscosidad, presencia de peróxido de hidrógeno y flavonoides, etc. De esta manera aunque la carga microbiana inicial no suele ser excesivamente alta, disminuye progresivamente a medida que la miel envejece.

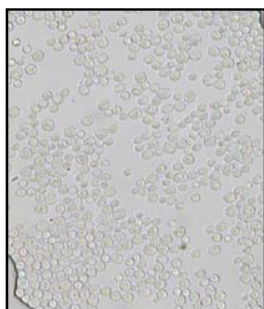


Figura I.1. Levaduras en la miel

Hay tres tipos de flora microbiológica que pueden encontrarse en la miel [Tysset & Rousseau, 1981; Ortiz Valbuena, 1992]:

a) HONGOS: principalmente hongos filamentosos del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* o esporas del “moho del polen”, *Pericystis alvei* Betts.

b) LEVADURAS: Las levaduras frecuentemente encontradas en la miel (figura I.1.) son fundamentalmente osmófilas del género *Saccharomyces*: *S. bisporus* variedad

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

mellis, *S. rouxii* y *S. bailii* variedad *osmophilus*. Aunque también aparecen otros géneros de levaduras como *Nematospora*, *Psaccharomyces*, *Schizosaccaromyces*, etc. Son las levaduras las responsables de la fermentación de la miel.

c) BACTERIAS: También se pueden dar fermentaciones bacterianas, pero son muy poco frecuentes en comparación con las de levaduras. La flora bacteriana normal de la miel está compuesta por microorganismos del género *Bacillus*, generalmente esporulados, aunque en mieles frescas se pueden encontrar formas vegetativas que se comportan como gérmenes inertes, no alterantes ni toxigénicos. Esporas de *Clostridium* (por ejemplo *C. botulinum*) pueden estar también presentes, además de *Pseudomonas* y *Micrococcus*, por lo cual no se recomienda este producto en niños menores de 1 año.

Los mohos, levaduras y esporas de *Bacillus* son los únicos microorganismos que estando el producto en condiciones idóneas aparecen de forma natural en la miel. El problema surge cuando se produce un crecimiento incontrolado de estos microorganismos, que es la alteración más frecuente que presenta este alimento durante su almacenamiento. Ciertas bacterias, ajenas a las descritas, sobreviven en la miel pero su crecimiento es improbable [Snowdon & Cliver, 1996].

Las mieles de mielato presentan esporas de hongos, microalgas e hifas de forma natural debido al origen de la mielada. Son los denominados elementos de mielada que se utilizan para distinguir microscópicamente una miel de néctar de un mielato.

1.2.3. Otros componentes

➤ GRANOS DE POLEN

Al examinar el residuo insoluble de la miel, a no ser que haya sido filtrada exhaustivamente, aparece una gran cantidad de granos de polen, superiores incluso a 100000 granos por gramo de miel. Estos granos de polen provienen de las plantas libadas por las abejas, ya que al posarse en la flor, el polen se adhiere a su cuerpo y patas, provocando la posterior “contaminación” del néctar. Otras formas de llegada del polen a la miel son más ocasionales, como es el caso de pólenes de tipo anemófilo que están presentes en el ambiente.

La identificación de la planta originaria de este polen y su cuantificación constituye el análisis melisopalinológico de la miel. Este análisis aportará una información crucial sobre el origen botánico y, en muchas ocasiones, también el geográfico de la miel.

1.3. Propiedades funcionales de la miel



Figura 1.2. Figura humana recolectando miel. Cuevas de la Araña (Bicorp, Valencia).

La miel que durante miles de años ha sido la única fuente de azúcar concentrado de numerosas culturas, se ha utilizado como parte de la medicina tradicional a largo de todo el planeta. Ejemplo de esto, son las pinturas rupestres que representan hombres recolectando miel aparecidas en las cuevas paleolíticas de Bicorp (Valencia), figura 1.2., o el rollo de papiro que se encontró en Egipto en el año 1550 a.C. que contiene una serie de recetas contra diferentes enfermedades, en las que figura la miel como elemento principal entre los medicamentos prescritos [Prior Canales, 1989].

Las utilidades curativas de la miel son muy diversas, debido al número de propiedades fisiológicas que posee; es antibacteriana, antiviral, antiparasitaria, antioxidante, antiinflamatoria, protectora del pardeamiento enzimático e incluso, posee propiedades antimutagénicas y antitumorales. Gran parte de estas propiedades son atribuidas a los compuestos fenólicos que contienen.

Entre estos compuestos fenólicos los de mayor potencial son los flavonoides que exhiben en sí mismos un amplio abanico de propiedades terapéuticas como antibacterianos, antivirales, antiinflamatorios, antialérgicos y acción vasodilatadora [Viuda-Martos et al., 2008].

Las cualidades terapéuticas que tiene la miel, ya sea debido a los flavonoides u otros componentes, se pueden usar para combatir algunas enfermedades tales como: úlcera intestinal, diarrea, diabetes, afecciones respiratorias, heridas o para prevenir la salud dental [The National Honey Board, 2002].

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

➤ ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La miel debido a su contenido en compuestos fenólicos, aminoácidos, enzimas, vitamina C, ácidos orgánicos, carotenos, etc., posee una importante capacidad antioxidante. Esta propiedad contribuye a la prevención de ciertas enfermedades de tipo cardiovascular, cáncer o diabetes [Viuda-Martos et al., 2008].

➤ ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, ANTIVIRAL Y ANTIPARASITARIA

La actividad antimicrobiana de la miel se achaca a varios factores, por un lado a los componentes químicos presentes en la miel, como el peróxido de hidrógeno y otros componentes, no relacionados con este compuesto, comúnmente denominados “no peróxido”; y por otro, a las propiedades físicas inherentes a este alimento como son la alta viscosidad, la osmolaridad, la baja actividad de agua y su acidez característica [Molan, 1992].

➤ ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

En los últimos 30 años numerosos estudios han avalado las propiedades antiinflamatorias de la miel. Dichos efectos fueron estudiados por Al-Waili & Boni [2003] que observaron como bajaban los niveles plasmáticos de prostaglandinas tras ingerir miel. Algunos estudios encuentran como responsables de esta actividad compuestos de tipo flavonoide, como el galangín y el crisín, que reduce la expresión del COX-2, enzima clave desencadenante del proceso inflamatorio. Otro compuesto presente en la miel con efecto antiinflamatorio es el éster feniletil del ácido cafeíco que inhibe la secreción del ácido araquidónico en la membrana de la célula [Viuda-Martos et al., 2008].

➤ CURACIÓN DE HERIDAS

Cabe destacar la aplicación terapéutica más estudiada y utilizada de la miel, la cicatrización de heridas y quemaduras. Esta propiedad curativa fue investigada en profundidad por Subrahmanyam [1991; 1993a; 1993b; 1994; 1996; 1997; 1999], Molan [1996; 2001; 2002; 2006], entre otros autores [Bourne, 1991; Weheida et al., 1991; Phuapradit & Saropala, 1992; Greenwood, 1993]. Tal es su aplicabilidad

terapéutica que incluso se han llegado a patentar apósitos impregnados en miel para el tratamiento de heridas como *Revamil®* y varias marcas comerciales como *Active Manuka®*, *Medihoney®* o *Activon®* provenientes de miel de Manuka. Eso sí, para poder ser utilizadas en aplicaciones médicas estas mieles deben ser esterilizadas con radiaciones Gamma para destruir las esporas de clostridios (*Clostridium botulinum*, *perfringens*, etc.) que pudieran contener (evitando, de esta forma, posibles casos de contagios de botulismo o gangrena), radiaciones que no todas las variedades de miel pueden soportar, sin perder sus propiedades.

La actividad antimicrobiana de este producto es de manera sustancial, la que previene y trata las infecciones. Pero además de dicha actividad, otros efectos terapéuticos que se observan al poner en contacto la herida con la miel son: una cicatrización más rápida, ya que se estimula la regeneración tisular; reducción de la inflamación y mejora en el confort del vendaje debido a la baja adhesión del apósito a los tejidos [Molan, 2001; The National Honey Board, 2002].

➤ ACTIVIDAD ANTIMUTAGÉNICA Y ANTITUMORAL

Varios autores han estudiado la inhibición del crecimiento de tumores y de líneas celulares tumorales *in vitro* [Hamzaoglu et al., 2000; Pichichero et al., 2010; Samarghandian et al., 2011; Saxena et al., 2012] y se ha visto que la miel tiene efectos terapéuticos y acción profiláctica frente a neoplasias causadas por factores medioambientales mutagénicos y carcinogénicos.

El efecto antitumoral de la miel parece ser debido a una multitud de procesos, muchos de ellos relacionados con la actividad antioxidante. Compuestos fenólicos que se encuentran en este alimento funcional, tales como quercetín, ácido p-cumárico, y ácido cafeico, son ejemplos de antioxidantes que han desplegado efectos antimutagénicos [Alvárez-Suárez et al., 2010b]. En una de estas investigaciones, Wang et al. [2002] llevaron a cabo un estudio comparativo de los efectos antimutagénicos de 7 variedades de miel y de un preparado azucarado similar a la miel, frente a un mutágeno muy frecuente en la dieta humana, el Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido [4,3-b] indol). El objetivo fue ver cómo influían los componentes antioxidantes de la miel, en concreto flavonoides, en su actividad antimutagénica. Descubrieron que el efecto es similar en miel que en el preparado glucídico, lo que implica que son los

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

azúcares los que desplegaron este efecto y no los flavonoides. Por otro lado, parece que son particularmente los monosacáridos (glucosa y fructosa), los que tienen un mayor efecto antimutagénico. Por el contrario, Saxena et al. [2012] encontraron que aunque la miel es un alimento natural antimutagénico de amplio espectro, uno de sus principales factores anticancerígenos son los compuestos fenólicos. También Tsiapara et al. [2009] achacaron este efecto a los compuestos fenólicos y vieron que una dieta enriquecida en miel de tomillo, como alternativa al azúcar, puede prevenir el cáncer de mama, de próstata y de células endometriales.

➤ ACTIVIDAD FRENTE A DESORDENES INTESTINALES

La utilización de la miel para la prevención y tratamiento de los desordenes gastrointestinales tales como úlceras peptídicas, gastroenteritis, gastritis, se conoce al menos desde la época romana [Bogdanov et al., 2008].

La miel es un potente inhibidor del causante de úlceras peptídicas y gastritis, la bacteria *Helicobacter pylori* [Ali et al., 1991; Al Somal et al., 1994]. Otros autores achacan esta propiedad protectora del estómago a los flavonoides de la miel, que aumentan el contenido mucoso de las prostaglandinas de la mucosa gástrica e inhiben las secreciones ácidas, previniendo de esta forma la ulceración [Speroni & Ferri, 1993; Vilegas et al., 1999, Bogdanov et al., 2008]. Otras teorías abogan por una sinergia de varios componentes como responsables de esta propiedad, entre ellos: flavonoides, esteroides, terpenos, saponinas, gomas y mucílagos [Viuda-Martos et al., 2008].

2. LA CALIDAD DE LA MIEL

La miel, tal como nos la suministran las abejas, es un alimento natural, de fácil conservación, que no necesita ningún tipo de tratamiento o manipulación para su consumo, gracias a la alta concentración de azúcares que contiene y a su carácter ácido, entre otros conservantes naturales.

Pero la miel, al envejecer de manera natural o a causa de una mala conservación, puede sufrir diferentes alteraciones que merman su calidad. Estas alteraciones suelen ser fermentación, cristalización y otras alteraciones debidas al envejecimiento.

➤ La fermentación es un proceso natural que sigue habitualmente a la cristalización o granulación; aunque también se puede producir tempranamente si se dan condiciones de humedad elevadas (>20%) de la miel, alta humedad relativa del aire, junto con una temperatura inadecuada de conservación y una carga inicial abundante de levaduras. En general, es un proceso que sufre el producto provocado por el crecimiento descontrolado de las levaduras osmófilas, presentes de manera natural en este alimento. Cuando la miel fermenta, la separación del hidrato de dextrosa (glucosa) de la solución deja una fase líquida, produciéndose las 2 fases características de la fermentación. Los productos de la fermentación son polioles: glicerol, D-arabitol, eritriol y manitol; y ácidos orgánicos, que originan un olor agrio y un burbujeo que hace desagradable y poco saludable, la ingestión de este alimento.

➤ La cristalización se produce porque la miel es una solución supersaturada en azúcares, es decir hay mucho azúcar en relación a la cantidad de agua que contiene. La forma monohidratada de la glucosa puede servir como semilla o núcleo de cristalización. Adicionalmente, la cristalización puede ser estimulada por cualquier partícula pequeña de polvo, polen, pedacitos de cera o propóleos, burbujas de aire, presentes en la miel. A mayor cantidad de glucosa y menor cantidad de agua, mayor rapidez de cristalización, así el coeficiente que resulta de dividir el porcentaje de glucosa entre el de agua, puede darnos idea de la tendencia a la cristalización [White et al., 1962]. De forma general este fenómeno está muy relacionado con el tipo de miel. El mayor problema de la cristalización es que se forman dos fases, una sólida con la glucosa cristalizada y otra líquida, con todo lo demás. El alto contenido de agua de la fase líquida permite el crecimiento de las levaduras y provoca la anteriormente citada fermentación, que es lo que realmente estropea el producto [Ruiz Matute, 2007].

➤ El envejecimiento natural de la miel conlleva el deterioro de las propiedades del producto. Habitualmente se produce un aumento de la acidez y del hidroximetilfurfural (HMF), se intensifica el color, disminuye el contenido en azúcares reductores, la actividad enzimática y antibiótica, y se va perdiendo aroma y sabor característicos. Con el paso del tiempo este alimento pierde en parte sus características originales, de manera general se estiman dos años para un consumo preferente.

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

En cuanto al control de calidad microbiológico, aunque la antigua Orden relativa a la calidad de la miel [BOE nº193 de 13 de agosto de 1983] si recogía normas microbiológicas, la legislación vigente [BOE nº186 de 5 de agosto de 2003], que deroga la anterior, no pauta normas en este ámbito. Esta normativa actual está en concordancia con el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 [DOUE L 338/1 de 22 de diciembre de 2005] relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, donde la miel es considerada como un “alimento listo para el consumo” por lo que no requiere, en condiciones normales, de control microbiológico de cara a su comercialización y consumo.

Al evaluar la calidad de la miel, también hay que tener en cuenta la posible presencia de contaminación química por residuos, que pueda dejar el uso de productos utilizados para el tratamiento de las abejas o por tratamientos proferidos a las plantas que liban las mismas. Los niveles de residuos farmacológicamente activos como antibióticos, acaricidas o repelentes, tienen que ser controlados en base al Reglamento (CE) Nº 37/2010 [DOUE L 15/1 de 20 de enero de 2010] que marca los límites máximos tolerables.

Como se ha visto hay varios procesos físicos, químicos y biológicos que pueden afectar a la composición original del producto, a sus características organolépticas y finalmente, a la valoración por parte del consumidor y que habría que controlar previamente a la puesta en el mercado del producto. Por estos motivos se han establecido las condiciones que debe cumplir una miel respecto a su composición. Estas condiciones vienen recogidas en la legislación europea mediante la Directiva 2001/110/CE [DOUE L 10/47 de 12 de enero de 2002], que fue adaptada a la normativa española mediante el Real Decreto 1049/2003 [BOE nº186 de 5 de agosto de 2003]. También en el Codex Alimentarius [2001] *para la miel* vienen recogidas las especificaciones que debe cumplir una miel (que coinciden con las anteriores), aunque dichas especificaciones están destinadas a la aplicación voluntaria por parte de asociados comerciales y no a la aplicación por los gobiernos, a diferencia de la Directiva europea que si es obligatoria para los países de la Unión Europea.

A continuación se comentan los distintos parámetros utilizados para controlar la calidad de la miel que vienen recogidos en la legislación vigente. En primer lugar, se

describen los parámetros físico-químicos que evalúan características específicas de la calidad y en segundo lugar, se comentan los parámetros que se refieren a los índices de frescura.

2.1. Parámetros físico-químicos de calidad

2.1.1. Azúcares

Con este parámetro se evalúa la madurez de una miel ya que con el paso del tiempo se pierden azúcares reductores (glucosa y fructosa). El contenido de azúcares que marca la normativa es básicamente que, la suma de fructosa y glucosa en mieles de flores no debe ser menor de 60 g/100 g y en la miel de mielada o mezclas con miel de flores, no menos de 45 g/100 g.

También refleja el contenido de sacarosa, que en general no debe ser superior a 5 g/100 g, con algunas excepciones.

La técnica para la determinación de azúcares que recoge la legislación [BOE nº145 de 18 de junio de 1986] es el método de Fehling.

2.1.2. Humedad

Es un parámetro fundamental de calidad de este alimento porque condiciona la cristalización (variaciones de un 1% en miel líquida pueden influir en la granulación final) y la fermentación (fenómeno frecuente si la humedad es alta). La miel es higroscópica, capta humedad exterior, lo que puede aumentar su susceptibilidad frente a un ataque microbiano [Crane, 1975], por lo cual es aconsejable mantenerla en un recipiente cerrado, aislándola así de la humedad ambiental.

La legislación europea permite que el contenido hídrico de una miel madura sea de hasta un 20%. Si se superan estos valores es susceptible de fermentación, lo que daría lugar a una variación de sus propiedades organolépticas (color, sabor, palatabilidad), peso específico, viscosidad y, en consecuencia, la disminución de su valor económico en el mercado [De Lorenzo, 2002]. Hay excepciones a esta norma, es el caso de la miel de brezo (*Calluna vulgaris*) cuyo máximo de humedad permitido está

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

en un 23%, debido a que esta miel contiene una proteína que permite retener más agua, sin que exista alteración alguna. Para usos industriales se permiten valores más altos de humedad, hasta un 23% y en el caso de miel de brezo hasta un 25% [DOUE L 10/47 de 12 de enero de 2002].

La humedad es obtenida a través de la medida del índice de refracción y posterior comparación con las tablas estandarizadas de Chataway, que proporcionan la equivalencia entre el índice de refracción y el contenido en agua. Los valores determinados por el método oficial son algo inferiores al contenido real de agua, que sólo puede ser medido mediante valoración Karl Fischer [Bogdanov et al., 2004].

2.1.3. Sólidos insolubles

Con este parámetro se evalúa la limpieza del producto. En general no debe haber más de 0.1 g/100 g, con la excepción de la miel prensada, a la cual se le admite hasta 0.5 g/100 g.

La determinación se basa en el aumento de peso que experimenta un crisol poroso después de filtrar por él una cantidad conocida de miel en agua ligeramente alcalinizada.

2.1.4. Acidez y pH

Además de tener sabor dulce, la miel posee un gusto ácido, debido a los ácidos que contiene, como ocurre en otros líquidos naturales (mosto, miel, aceite, vino, etc.). Estos ácidos pueden provenir de las secreciones nectaríferas de las plantas libadas, de las secreciones salivares de las abejas, de la utilización de panales viejos o ser generados *in situ* en la propia miel, como es el caso del ácido glucónico, que se genera por descomposición de la glucosa por acción de la enzima glucosa-oxidasa. Los ácidos contribuyen al sabor y a la estabilidad microbiológica de la miel [White et al., 1958].

Todos los tipos de mieles tienen un carácter ácido con un valor de pH entre 3.5 y 5.5.

Se habla de dos tipos de acidez, la acidez libre y la acidez láctónica (o reserva de acidez). La acidez libre proporciona el valor de los ácidos orgánicos libres que se encuentran en la miel, mientras que la acidez láctónica es el valor de los ácidos orgánicos combinados, lactonas, las cuales constituyen una reserva de acidez para la miel ya que pueden liberarse en caso de procesos de alcalinización. La acidez total es la suma de ambas.

La transformación de alcoholes en ácido acético por acción de levaduras y bacterias en mieles fermentadas, incrementa los valores de acidez. Debido a esto y para evitar la puesta en el mercado de mieles fermentadas, hay que aplicar un control frente a este parámetro. La norma española y europea sólo se pronuncia en cuanto a acidez libre. Dice que los ácidos libres no deben superar los 50 meq/kg de miel, con la excepción de las mieles destinadas a uso industrial cuyo límite es 80 meq/kg. En algunas ocasiones, el exceso de acidez no implica necesariamente un mal procesamiento del producto, es más bien una característica de algunas variedades de miel (lo cual no está y debería ser explicitado en la norma). Es más, se cree que la presencia de ácido glucónico mejora las propiedades del sabor [Gómez-Pajuelo, 1996].

La metodología en vigor para determinar la acidez libre consiste en una valoración por neutralización con una base (NaOH 0.1M) hasta un pH de 8.5 [BOE nº145 de 18 de junio de 1986].

2.1.5. Conductividad eléctrica

La capacidad de la miel para conducir la corriente eléctrica se debe a la presencia de sales minerales, ácidos orgánicos, proteínas, azúcares y polioles [Crane, 1975]. Se trata de un valor estable que apenas se modifica durante el almacenamiento.

La medida de la conductividad eléctrica en miel fue estudiada en profundidad e introducida por Vorwohl [1964]. Este autor propuso que la medida de esta propiedad física se realizase utilizando soluciones al 20% de materia seca. Observó que las mieles de mielato tenían mayor conductividad que las de origen floral y, que mieles de un mismo origen floral presentan conductividades eléctricas muy semejantes, a pesar de tener orígenes geográficos y condiciones climatológicas diferentes [Zandamela, 2008].

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

Es uno de los parámetros de calidad más útiles para la clasificación de las mieles monoflorales, que además puede ser determinada con una instrumentación bastante asequible [Bogdanov et al., 2004].

La normativa distingue entre miel de flores, con conductividades inferiores a 0.8 mS/cm y, por otro lado, mieles de mielato, castaño y mezclas mielato-castaño, que deben presentar valores superiores a este valor. Hay excepciones para las mieles florales de madroño, argaña, eucalipto, tilo, brezo, manuka o árbol del té [DOUE L 10/47 de 12 de enero de 2002; BOE nº186 de 5 de agosto de 2003].

La conductividad eléctrica ha ido reemplazando, en los parámetros de calidad necesarios para evaluar una miel, al contenido en cenizas en las normativas que iban apareciendo. Ambas están relacionadas con el contenido mineral, pero la conductividad tiene la ventaja de que es más rápida y fácil de medir [Bogdanov et al., 2004].

El método utilizado para medir la conductividad eléctrica en miel es el descrito en los métodos de análisis de miel [BOE nº145 de 18 de junio de 1986] que consiste en una medida directa de una disolución al 20% de materia seca en un conductímetro a 20°C.

2.1.6. Color

El color es de gran importancia para el consumidor en la aceptabilidad de un alimento. En concreto en la miel, el color contribuye de manera decisiva a fijar un valor económico, llegando a condicionar incluso su uso comercial. A pesar de que ni la normativa nacional sobre calidad de la miel, ni la europea reflejan este parámetro, es interesante analizarlo, sobre todo desde un punto de vista de tipificación de mieles, ya que está estrechamente relacionado con el origen botánico y, en definitiva, con la composición del néctar y los pigmentos vegetales que contenga (carotenos, xantofilas, sales minerales, etc.). De manera habitual, en la miel fresca, el color de la miel puede variar desde casi incoloro hasta prácticamente negro pasando por tonalidades amarillas, ámbar, marrones, con matices verdes y rojizos. Comercialmente se tiende a asignar una serie de grados de color establecidos, así se habla de: blanco agua, extra blanco, blanco, ámbar extra claro, ámbar claro, ámbar y ámbar oscuro; y se identifican

con un número que va de 1 a 140 en unidades de mm de Pfund (figura I.3) [Sechrist, 1925; Mateo et al., 1992].

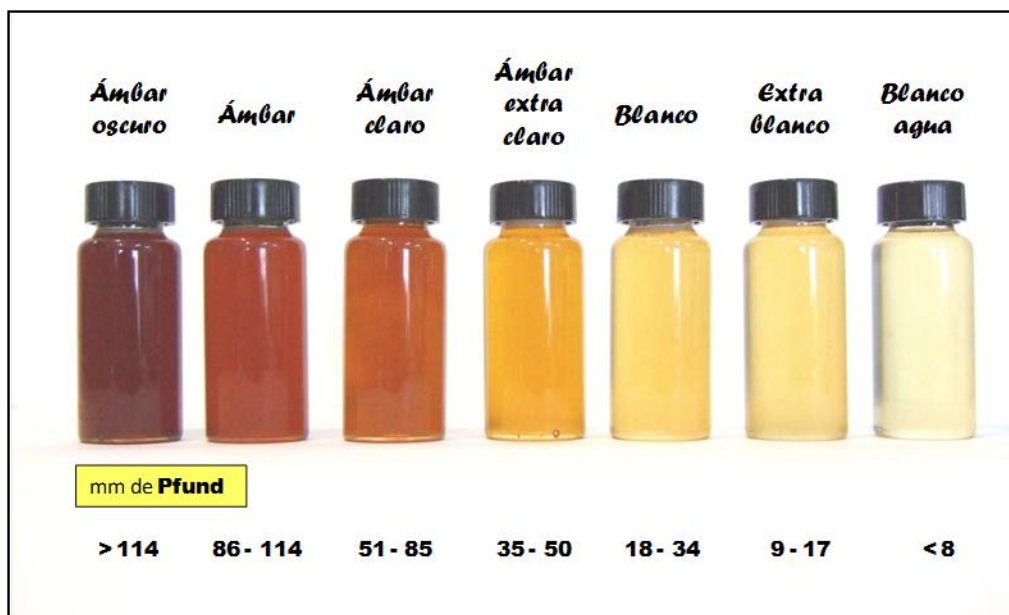


Figura I.3. Escala de color de la miel.

La práctica apícola también puede influir en las tonalidades de la miel. Por ejemplo, el uso de ceras viejas y ennegrecidas, el calentamiento excesivo o el almacenamiento en recipientes inadecuados pueden oscurecer la miel. El envejecimiento natural también provoca oscurecimiento del color de la miel debido a la inestabilidad de la fructosa en medio ácido [Ortiz Valbuena et al., 1996].

La cristalización también influye, el color tiende a ser más oscuro e intenso en una miel líquida que en una cristalizada. Por este motivo, debería considerarse la inclusión de este parámetro en la propuesta del control de calidad de la miel, al menos, en cualquier Denominación o Indicación de Origen Protegida, donde se implantan las características típicas y restrictivas de las mieles específicas de ese área.

Físicamente el color se define como el resultado de la interacción entre el observador, el objeto iluminado y un foco de luz. La percepción del color por los ojos y posteriormente por el cerebro puede estar afectada por muchos factores y no sólo varía de un observador a otro, también para el mismo observador dependiendo del

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

entorno y del tipo de luz. De esta manera, la utilización de cartas de colores u otros sistemas como los colorímetros, que son unos cristales coloreados que llevan un número aparejado (en unidades de mm de Pfund) con los cuales se compara la muestra de miel, son medidas totalmente dependientes del observador, pero a pesar de este inconveniente es el instrumento oficial más utilizado para la clasificación de la miel líquida.

La problemática de la poca objetividad en la medida ha llevado a la búsqueda de otros métodos con el fin de obtener unos datos de color objetivos. Entre ellos está el espacio de color CIELAB (estrictamente CIE 1976 $L^*a^*b^*$) que es el modelo cromático usado normalmente para describir todos los colores que puede percibir el ojo humano. El modelo sólo puede ser representado adecuadamente en un espacio tridimensional. Consiste en la determinación del color de la miel mediante medidas de transmitancia por espectrofotometría UV-Visible. A partir de estas medidas se obtienen, por relaciones matemáticas, los distintos parámetros para definir el color: claridad o luminosidad (L^*), cromaticidad rojo/verde (a^*), cromaticidad amarillo/azul (b^*), croma (C^*_{ab}) y el ángulo de tono (h^*). El método también tiene en cuenta la turbidez [Ortiz Valbuena et al., 1996].

La figura I.4A representa una circunferencia de cromaticidad en la que el centro tiene una tonalidad indefinida. El parámetro a^* se sitúa en el eje de abscisas, en la parte positiva indica tendencia hacia el color rojo y en la negativa al verde. En el eje de ordenadas se localiza el parámetro b^* que indica tonalidad amarilla para los valores positivos y tonalidad azulada para los negativos. En cuanto a la coordenada L^* se sitúa en el eje Z y nos da idea de la luminosidad de la miel, figura I.4B y I.4C.

El ángulo de tono (h^*) es aquel que forma el vector del punto que representa el color proyectado sobre el plano de cromaticidad a^* , b^* con el eje a^* positivo. Es el atributo de la sensación visual que permite apreciar en una superficie uno sólo de los colores rojo, amarillo, verde o azul, o una combinación de estos.

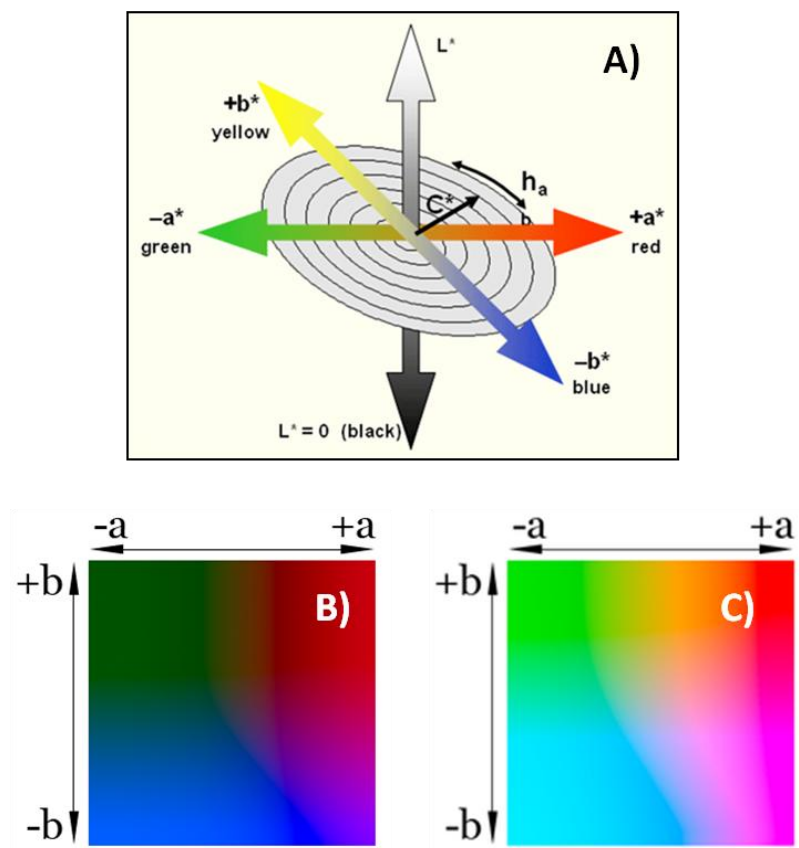


Figura 1.4. A) Escala de color CIELAB. Representación del color. B) $L^* = 25\%$
C) $L^* = 75\%$

El croma (C^*_{ab}) es igual al módulo del vector que une el punto representativo del color, proyectado sobre el plano a^* , b^* , con el centro de coordenadas, o sea, la distancia entre el centro y el punto proyectado sobre el plano de cromaticidad. El croma representa la cantidad de color, su medida está en relación con la distancia a las coordenadas de origen.

Este método fue utilizado por vez primera en mieles por Ortiz Valbuena [Ortiz Valbuena & Silva, 1990; Ortiz Valbuena, 1992] en el Laboratorio de Mieles perteneciente a la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

2.2. Índices de frescura

2.2.1. Hidroximetilfurfural (HMF)

El hidroximetilfurfural o 5-(hidroximetil)-2-furancarboxilaldehído (HMF) no es un componente habitual de la miel fresca, se genera por deshidratación de la fructosa en el medio ácido de la miel formándose un aldehído cíclico, proceso que se acelera por calentamiento y se acentúa con el grado de envejecimiento. La presencia de HMF, junto con compuestos aminados y azúcares en el producto, provocan su oscurecimiento.

El límite máximo de este parámetro no debe superar los 40 mg/kg en zonas templadas y 80 mg/kg en zonas tropicales [DOUE L 10/47 de 12 de enero de 2002; BOE nº186 de 5 de agosto de 2003]. Con este índice es posible conocer el grado de frescura (tiempo transcurrido desde su recolección), detectar posibles adulteraciones (al adulterar la miel con sacarosa, aumenta el índice) o si se ha expuesto la miel a algún tratamiento térmico.

Tradicionalmente el método más usado para su determinación ha sido el método de White [1979], pero actualmente se recomienda un método por HPLC-UV, sobre todo, para valores de HMF por debajo de 20 mg/kg [Bogdanov, 2002].

2.2.2. Actividad diastásica

La enzima diastasa o amilasa se origina en las glándulas hipofaríngeas de las abejas obreras y su función es catalizar la hidrólisis del almidón y compuestos relacionados, originando maltosa, maltotriosa y alfa-dextrina. Esta enzima se degrada fácilmente con el calor y el envejecimiento.

La Norma contempla la actividad diastásica como una medida del grado de frescura, al igual que el HMF [BOE nº186 de 5 de agosto de 2003]. Niveles elevados de HMF y bajos de diastasa serían indicativos de una conservación inadecuada (calentamiento o envejecimiento). En el caso de las diastasas requiere que, para que una miel sea destinada al consumo humano, el índice sea superior a 8 unidades, aunque se admite un mínimo de 3 para algunos tipos de miel (por ejemplo, mieles de

cítricos), siempre que el HMF no sea superior a 15 mg/kg. Esta excepción se debe a que existen mieles que se caracterizan por tener, de manera natural, un alto o un bajo índice diastásico [Persano Oddo et al., 1990].

Las metodologías para la determinación de la actividad diastásica se fundamentan en la capacidad de la enzima para hidrolizar el almidón y se cuantifica a través de la formación de un complejo coloreado almidón-yodo. Se evalúa, concretamente, la velocidad de hidrólisis del almidón por las diastasas.

3. IDENTIFICACIÓN DEL TIPO DE MIEL. LA CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA Y GEOGRÁFICA DE MIELES.

La miel es un producto natural que habitualmente las abejas obtienen de un gran número de flores. No es fácil definir de forma exacta un tipo concreto de miel. No existen mieles monoflorales totalmente puras para tomarlas como referencia, debido a que las abejas liban de múltiples especies de plantas. Tal es así que una miel monofloral, siempre tiene “contaminación” de otros néctares o mieladas. Por lo tanto, es una tarea complicada decidir qué cantidad mínima de un determinado néctar debe considerarse para decir que una miel es de una variedad floral concreta.

De esta forma, la evaluación de un parámetro analítico no suele ser suficiente para determinar el origen botánico y geográfico de una miel. Es necesario conocer y contrastar datos de varias características inherentes a la variedad miel, que nos den una idea más global del producto. Con este fin se utilizan los datos de diferentes áreas de conocimiento como son: los análisis melisopalinológicos (contenido de polen), las determinaciones físico-químicas y los análisis sensoriales.

3.1. Melisopalinología

Para intentar solucionar esta problemática se desarrolló la Melisopalinología. Se acordaron los porcentajes mínimos de polen de planta nectarífera¹ presente en una miel para denominarla como monofloral. Si no cumplía este mínimo se incorporaba al

¹ Planta que segrega néctar aprovechable por las abejas.

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

grupo de las mieles multiflorales o milflores. Para ello, se contó con estudios previos sobre conocimiento de las plantas del entorno de una colmena, de la producción de polen de las distintas plantas y de su relación con un tipo de producción de miel. Los límites de proporciones de polen considerados actualmente para definir las mieles monoflorales en España se acordaron en la reunión de la APLE (Asociación de Palinólogos de Lengua Española), que tuvo lugar en 1980, previamente a la publicación de la ORDEN de 12 de junio de 1986 [BOE 145 del 18 de junio de 1986] por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para la miel.

La identificación y cuantificación de granos de polen en el sedimento de miel, la melisopalinología, es todavía el método más importante para determinar el origen botánico de la miel. Esta disciplina estudia los granos de polen y los elementos de mielada mediante un examen microscópico de su sedimento, ya que todas las mieles naturales tienen en su composición los elementos procedentes de las flores o de la mielada que la originaron [Carretero, 1989]. El espectro polínico que se obtiene durante este análisis es un reflejo de las plantas de interés apícola en el entorno del colmenar. La melisopalinología es la ciencia que tradicionalmente ha determinado, tanto la procedencia botánica, como la procedencia geográfica, proporcionando además, información importante sobre la calidad de la miel: si ha sido sometida a extracción y filtración, si ha fermentado (debido a la presencia de levaduras), detección de algunos tipos de adulteración y aspectos higiénicos, como la presencia de impurezas orgánicas (ceras, restos de abejas o granos de almidón) e inorgánicas (contaminación con polvo u hollín, entre otros) [Von der Ohe et al., 2004].

Para un análisis estimativo del origen floral de una miel hay que identificar entre 200 y 300 granos de polen. Son de gran ayuda como referencia a la hora de la identificación, los atlas fotográficos y las palinotecas propias. Estas últimas son, recopiladas por el analista, consisten en recoger granos de polen directamente de cada planta y hacer una preparación al microscopio para utilizarla como referencia. La figura I.5. muestra una muestra de miel vista al microscopio.

Generalmente, para poder definir una miel como monofloral, el contenido de polen de la especie vegetal dominante debe ser superior al 45% de los pólenes nectaríferos presentes en la muestra (polen principal o dominante).

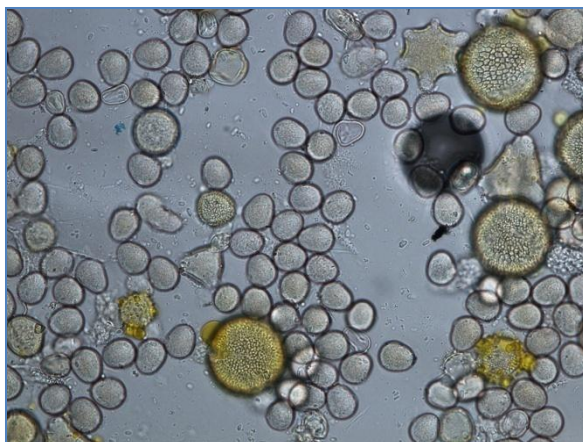


Figura I.5. Ejemplo de pólenes presentes en una muestra de miel vista al microscopio.

Se establecen excepciones a este mínimo de 45%, son especies en las que el polen puede estar infra o supra-representado (tabla I.2). Las especies supra-representadas son aquellas que producen mucho polen y, por lo tanto, se encuentran en porcentajes muy elevados en la miel. Suelen ser pólenes de tamaño pequeño (*Myosotis*, *Cynoglossum*, *Castanea sativa*, *Mimosa pudica*) [Ferrazzi, 1992]. Por el contrario, los pólenes infrarrepresentados son aquellos que aparecen en las mieles en escasa cantidad. La aportación correspondiente de néctar de esas especies en la miel es mayor que la proporción que indica su polen. De este modo: *Citrus*, *Lavandula*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia*, *Robinia*, *Tilia*, *Medicago*, *Epilobium*, Cucurbitaceae son pólenes que frecuentemente aparecen en bajo porcentaje [Louveaux et al., 1978]. Esto significa que las mieles de este origen botánico tendrán un contenido polínico bajo.

El polen se definirá como secundario cuando su contenido se encuentre entre el 16 y el 44% del total de pólenes; polen importante minoritario entre 4 y 15%; y minoritario entre 1 – 3% [Louveaux et al., 1978; Von der Ohe et al., 2004].

En el sedimento de las mieles de mielada existen algas microscópicas, esporas, hifas o restos de micelios fúngicos y polen, tanto de las plantas que lo segregan como de otras especies anemófilas [De Lorenzo, 2002]. Cuantitativamente se considera que predomina la miel de mielada cuando el número de elementos de mielada (HDE) es 3

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

veces el número de granos de polen [Louveaux et al., 1978; Persano Oddo & Piro, 2004].

Tabla I.2. Nivel de abundancia relativa y frecuencia relativa del polen principal de algunas mieles monoflorales [Von der Ohe et al., 2004].

Polen infra-representado	Polen infra-representado en algunas ocasiones	Polen normalmente representado	Polen supra-representado
<i>Arbutus</i> (8-20%)	<i>Calluna</i> (10-77%)	<i>Erica</i> (>45%)	<i>Castanea</i> (>86%)
<i>Carduus</i> (5-25%)	<i>Helianthus</i> (12-92%)	<i>Eryobotrya</i> (>45%)	<i>Eucalyptus</i> (>83%)
<i>Citrus</i> (2-42%)	<i>Rhododendron</i> (15-77%)	<i>Hedysarum</i> (>50%)	<i>Brassica napus</i> (>60%)
<i>Lavandula latifolia</i> (15-42%)	<i>Robinia</i> (7-60%)		<i>Phacelia</i> (>60%)
<i>Lavandula x intermedia</i> (1-20%)	<i>Rosmarinus</i> (10-57%)		
<i>Medicago</i> (1-10%)	<i>Thymus</i> (13-68%)		

La metodología clásica de diagnóstico del origen botánico de una miel, el análisis palinológico (apoyado por el análisis sensorial), tiene varias limitaciones ya que lleva un laborioso método de conteo cuya interpretación e identificación botánica es compleja, requiere de expertos en la materia que conozcan bien la morfología de la multitud de pólenes posibles. Pero es el método de elección para la identificación del tipo de miel. No se ha encontrado hasta el momento otro método que proporcione tanta información.

Los datos del análisis palinológico deben ser siempre corroborados con una serie de resultados físico-químicos y sensoriales característicos de la variedad, ya que una miel no podrá considerarse “miel de...” si no reúne las características propias de dicha variedad, aunque palinológicamente si lo sea [De Lorenzo, 2002].

3.2. Análisis sensorial

La calidad de un alimento, en nuestro caso la miel, puede definirse a través de un completo análisis instrumental, ya sea físico, químico, biológico o reológico, pero estos métodos analíticos deberían contrastarse con los datos procedentes de una evaluación organoléptica seria y eficaz por parte de un conjunto de catadores entrenados. Este aspecto entra en cierta contradicción con el perfeccionamiento de las técnicas instrumentales de análisis, precisas y carentes de la subjetividad inherente al ser humano; por ello hoy en día se ha llegado al planteamiento de un objetivo concreto: comparar los estudios sensoriales con los procedentes de ciertas técnicas instrumentales precisas. De esta forma se podrá conocer cuáles se aproximan más a las sensaciones experimentadas por el consumidor de miel, eliminando así, en lo posible, apreciaciones subjetivas.

Como se ha comentado, hay una amplia variedad de mieles y esa gran variedad también se ve reflejada en sus características organolépticas: diferentes colores, sabores, olores y texturas. Sobre todo el aroma y el sabor de la miel se caracterizan por su origen floral, debido a los aceites esenciales que se encuentran diluidos en el néctar de la flor [Martínez Pozo, 2004].

El análisis sensorial consiste en la evaluación de las características de un producto a través de los órganos de los sentidos:

➤ Vista: a través de ella se aprecian cualidades o defectos como: el aspecto exterior del producto, su limpieza, la formación de espumas, la separación de fases, una cristalización irregular, una fermentación incipiente y, por supuesto, la propiedad óptica más característica, el color. El espectro colorimétrico puede variar desde el blanquecino, pasando por el ámbar y los rojizos, hasta los prácticamente negros (figura I.3). La tonalidad que presenta la miel es un factor importante desde el punto de vista comercial y marca sustancialmente las preferencias del consumidor.

➤ Estímulos olorosos (olfato): pueden ser percibidos por vía nasal directa y por vía retronasal (comunicación fosas nasales-paladar). Este proceso tiene una gran carga subjetiva debido a las variaciones interindividuales en cuanto a los umbrales

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

absolutos de detección. Además, el umbral olfativo puede elevarse por efecto de la exposición prolongada al estímulo.

➤ Gusto: no existe sensibilidad específica para los 4 sabores básicos (dulce, ácido, amargo y salado), pero si existen regiones específicas de la lengua donde se aprecian cada uno de estos sabores. El proceso de “gustado” de una miel permite identificar y caracterizar otras sensaciones terciarias o de retrogusto², características de algunos tipos de mieles. También puede conocerse la consistencia de la miel de acuerdo a la sensación que produce en la lengua.

➤ Tacto: a través del tacto se puede apreciar el tamaño, la forma y la homogeneidad de los cristales, si los hubiera. También nos permite conocer dos parámetros reológicos fundamentales para definir el estado físico de la miel que son la adhesividad y la viscosidad.

➤ Oído: es el único sentido infravalorado en la apreciación cualitativa de la miel porque únicamente alcanza alguna significación al tratar con mieles alteradas por fermentación, dado que con la apertura del envase se apreciaría el sonido típico de burbujas ascendentes.

El análisis sensorial descriptivo es aquella parte del análisis sensorial que trata de describir un producto de manera objetiva y reproducible. Este análisis sienta sus bases en la identificación, descripción y cuantificación de todas las propiedades organolépticas diferenciables y diferenciadoras que contribuyen a la caracterización global de la muestra. El éxito de la caracterización organoléptica va a depender de la elección y entrenamiento de los jueces constituyentes del panel de cata [De Lorenzo, 2002].

En el caso de la miel, los análisis sensoriales fueron usados por vez primera en Francia hacia 1979. Las ideas planteadas por el equipo francés que lo puso en marcha,

² El retrogusto es la sensación que persiste en boca, particular de ciertas mieles. Tiene que ver con una segunda sensación, a veces relacionada con el gusto y otras, con el olfato, como una sensación que potencia del aroma.

fueron ampliamente desarrolladas en Italia, que establecieron la metodología estándar, incluyendo la terminología armonizada, y describieron sensorialmente las principales mieles italianas. Y a partir de aquí se llevó a cabo esta descripción en mieles de varios países europeos más. En 1998 la Comisión Internacional de la Miel recopiló y reorganizó gran información generada con los métodos tradicionales, y propusieron un método general basado en las normas ISO, reconocidas internacionalmente, para evaluar los defectos sensoriales y la conformidad con las mieles monoflorales [Piana et al., 2004].

En particular, el análisis sensorial es importante para verificar la conformidad de las mieles monoflorales, ya que puede revelar la presencia de componentes botánicos no detectados por los análisis palinológicos y/o físico-químicos. Este es el caso de la miel de lavandín, que actualmente sólo puede ser identificada sensorialmente, es una miel muy similar a la de espliego pero sin apenas polen de esta planta. Además con el análisis sensorial se pueden detectar ciertos defectos, como son: fermentación, impurezas, la pérdida de olor característico del tipo de miel, olor a humo, etc.

3.3. Otras técnicas de identificación

Prometedores enfoques analíticos, como la lengua electrónica [Ampuero et al., 2004; Lammertyn et al., 2004], la espectroscopia infrarroja [Lichtenberg-Kraag et al., 2001; García Álvarez et al., 2002; Lichtenberg-Kraag, 2003] o los isótopos radioactivos [White, 1992] han sido aplicados al análisis de miel a lo largo de las últimas décadas. Pero a estas técnicas les está costando asentarse en este campo, ya que para poder ser usadas en el control de calidad de rutina de este alimento, deberían ser ampliamente probados en mieles monoflorales auténticas y ser comparados con los ensayos clásicos [Persano Oddo & Bogdanov, 2004].

En esta línea, otra forma de simplificar la identificación del tipo de miel es mediante el estudio de sus marcadores químicos específicos. Entre ellos encontramos una línea de investigación muy ambiciosa, la evaluación de compuestos volátiles y semivolátiles, donde la técnica de análisis más utilizada es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), gracias a la cual se consigue identificar y cuantificar un gran número de compuestos [De Lorenzo, 2002; Alissandrakis et al., 2007; Odeh et al., 2007; Castro-Vázquez et al., 2009; Aliferis et al., 2010].

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

Otros parámetros que también se han utilizado como marcadores florales son: los ácidos orgánicos alifáticos, aminoácidos [Hermosín et al., 2003; Cotte et al., 2004b; Iglesias et al., 2004], azúcares [Mateo & Bosch-Reig, 1998; Cotte et al., 2004a; Sanz et al., 2004; De la Fuente, 2005; De la Fuente, 2007a y 2007b], ácidos fenólicos y flavonoides [Ferrerres et al., 1993; Andrade et al., 1997a y 1997b; Martos et al., 2000; Gheldof et al., 2002; Yao et al., 2004a y 2004b], compuestos volátiles proteínas [Wang et al., 2009] y medida de la relación de isótopos estables del Hidrógeno D/H o del Oxígeno $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ [Anklam, 1998]. El HMF, los residuos, la actividad enzimática, el análisis de la relación de isótopos estables del carbono $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, la humedad y el nitrógeno, son parámetros que no nos proporcionan información sobre el origen botánico o geográfico.

En cuanto a la identificación del origen geográfico, se basa principalmente en el análisis del espectro polínico, sobre todo para conocer el paisaje donde se ha producido la miel (bosque, valle, montaña, zona de cultivo, etc.), ya que cada paisaje tiene unas plantas características. También se ha intentado identificar el origen geográfico de las mieles aplicando diferentes métodos estadísticos a una serie de componentes o combinación de estos. Estos componentes o fenómenos físicos fueron: los parámetros físico-químicos de rutina [González-Paramás et al., 2000; Acquarone et al., 2007], aminoácidos [Cometto et al., 2003; Iglesias et al., 2004; Senyuva et al., 2009], compuestos aromáticos volátiles [Castro-Vázquez et al., 2010], minerales [González-Paramás et al., 2000; Fernández-Torres et al., 2005; Frías et al., 2008; De Alda-Garcilopez et al., 2012], perfil fluorescente [Ruoff et al., 2006], proteínas [Baroni et al., 2002; Wang et al., 2009] y ratios de isótopos (por ejemplo $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ estables) [Anklam, 1998].

4. OBJETIVOS GENERALES

En el sector apícola resulta todavía escaso el conocimiento de las propiedades funcionales y el valor nutritivo de la miel, sobre todo si se tiene en cuenta la importancia que sobre ello tiene la procedencia botánica y el área geográfica de producción. Por estos motivos se hace necesario un estudio exclusivo, no pudiendo generalizar en las propiedades y características de este producto. Hasta la fecha, apenas existen estudios sobre los diferentes tipos de mieles producidas en Castilla-La

Mancha (CLM), con origen botánico y geográfico conocido, a excepción de las mieles producida en la comarca de la Alcarria.

Con este fin, se ha llevado a cabo un amplio estudio sobre la identificación, las propiedades nutritivas y funcionales de varias mieles monoflorales producidas en esta Comunidad Autónoma. Los objetivos marcados son:

1. Describir las características físico-químicas, palinológicas y sensoriales de las mieles monoflorales de mayor producción y/o interés producidas en CLM. Las mieles objeto de estudio que no han sido descritas hasta la fecha son: la miel de castaño de la Sierra de San Vicente (Toledo); la miel de viborera producida en Toledo y Ciudad Real; los mielatos de encina producidos en Guadalajara y la miel de tomillo, de importante producción en la zona de la Alcarria.
2. Estudiar en profundidad el resto de mieles monoflorales de la Alcarria, romero y espliego. Estas mieles ya fueron en parte caracterizadas, pero se amplía el estudio con el objetivo de detallar sus características propias, no establecidas en estos términos en los trabajos anteriores sobre estas mieles, donde aparecían los límites máximos de los parámetros de calidad necesarios para envasar todos los tipos de miel comercializados (romero, espliego y milflores) de forma global, pero no explicitados individualmente. Con los datos individualizados por tipo de miel se podría afinar y concretar más en una identificación veraz de cada miel monofloral, llegando así a una selección ideal e imprimiendo de esta forma una excelente calidad al producto.
3. Analizar los contenidos de los componentes más abundantes de la miel, los azúcares mayoritarios, que pueden revelar datos particulares del tipo de miel.
4. Evaluar que parámetros físico-químicos son los más eficaces a la hora de discriminar entre los tipos de mieles estudiados.
5. Desarrollar una metodología cromatográfica para el análisis de vitaminas hidrosolubles en mieles. Aplicabilidad de un tensioactivo catiónico para este cometido. Evaluar en las mieles estudiadas los niveles que contienen de: ácido ascórbico (vitamina C) y del grupo B: tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), ácido nicotínico (vitamina B₃H), nicotinamida (vitamina B₃N), ácido pantoténico (vitamina B₅), piridoxina (vitamina B₆) y ácido fólico (vitamina B₉).

Capítulo I. Introducción y objetivos generales

6. Estudiar las propiedades antioxidantes de las mieles originarias de CLM mediante el análisis de la actividad antioxidante y los polifenoles totales. Estudiar qué papel juega la vitamina antioxidante por excelencia, la vitamina C, en la actividad antioxidante de las mieles.
7. Evaluar las propiedades antibacterianas de estas mieles y que factores composicionales son los responsables.
8. Analizar por vez primera, en mieles de diferente origen botánico, la actividad antihipertensiva mediante la medición de la disminución de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (IECA).

CAPÍTULO II:

Caracterización de mieles monoflorales producidas en Castilla-La Mancha

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El sector de la miel en España y en Castilla-La Mancha.

Para conocer cómo es la apicultura en Castilla-La Mancha, en primer lugar analizaremos cómo es el mercado español de miel y que relevancia tiene a nivel mundial. Posteriormente, evaluaremos qué importancia tiene el sector apícola de esta comunidad autónoma en España y cómo es a nivel provincial.

Según estimaciones de la FAO, en 2011 España se encontraba en el puesto número 14 **a nivel mundial** en producción de miel con 34000 toneladas métricas, lo que representa aproximadamente un 3% de la producción total. Aparece además como el 1^{er} productor de miel de la Unión Europea, por detrás únicamente de dos países europeos no pertenecientes a la UE, Ucrania y Rusia (figura II.1).

En cuanto al comercio exterior, según la FAO (últimos datos del año 2010), España importó 17717 t, siendo el 9º importador de miel del mundo. El país del cual

importó más miel fue de China con unas 11330 t, le siguieron Uruguay, Argentina y Guatemala.

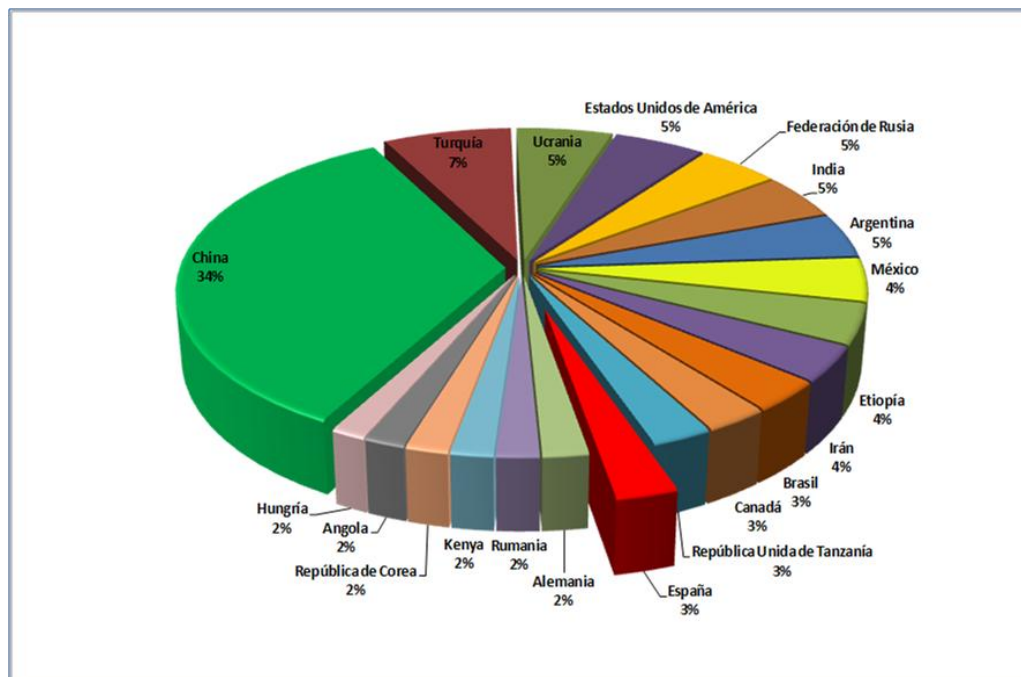


Figura II.1. Principales productores de miel del mundo en 2011. Fuente: FAO.

Este año, España estuvo en la 5ª posición como exportador de miel a nivel mundial con 21555 t. La mayor parte se exportó dentro del mercado europeo con 18799 t, siendo los mayores importadores de miel española: Francia, Alemania e Italia; el resto de toneladas fueron exportadas a países como Japón, Arabia Saudí, Argelia, Israel o Marruecos. Como podemos apreciar, España tiene una posición importante en el mercado mundial de la miel.

Analizando el **sector apícola interno español**, el número de colmenas en España en los últimos 11 años ha aumentado en más de un 10%, lo que supone un incremento en el censo de unas 300000 colmenas más (figura II.2).

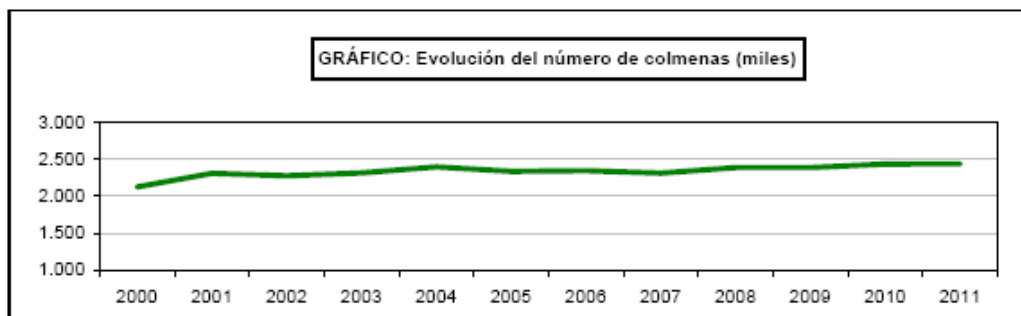


Figura II.2. Evolución de la apicultura española en cuanto al número de colmenas en los últimos 10 años. Fuente: Subdirección General de Estadística, 2011.

En cuanto a la producción de miel en España desde 1990 hasta el 2010, representada en la figura II.3, vemos que ha aumentado sustancialmente (en torno a un 32%), lo que supone unas 10000 t de miel más producidas; aunque este incremento no es del todo significativo, hay que tener en cuenta que la producción es muy variable dependiendo del año climatológico.

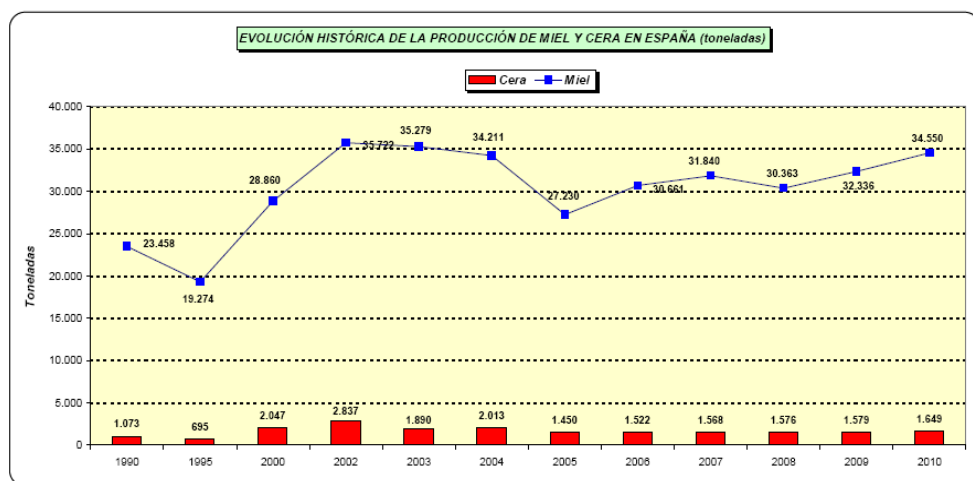


Figura II.3. Evolución de la apicultura española en cuanto a la producción de miel y cera desde 1990 hasta 2010. Fuente: Subdirección General de Estadística, 2011 y Subdirección General de Productos Ganaderos, 2012.

Capítulo II. Caracterización de mieles monoflorales producidas en Castilla-La Mancha

La cera, el siguiente producto apícola de mayor interés comercial tras la miel, en cuanto a su producción, ha ido cambiando a lo largo de estas 2 décadas, incrementándose hasta prácticamente el doble en la década de los noventa y cayendo a partir del 2002 en aproximadamente un 50% (figura II.3) [Subdirección General de Estadística, 2011].

Los precios que se pagan en España por los productos de mayor relevancia en el sector apícola, miel y cera, se han incrementado en casi un 50% desde el año 2000, tanto en miel como en cera, como puede observarse en la tabla II.1. Sin embargo, el beneficio, en el caso de la cera ha sido menor debido a que se han extraído menos toneladas que en años anteriores.

Tabla II.1. Precios percibidos por los apicultores por 100 kg de miel/cera y el valor total de la producción anual. Fuente: Subdirección General de Estadística 2011.

Años	Precios percibidos por los apicultores (euros/100kg)		Valor (miles de euros)	
	Miel	Cera	Miel	Cera
2000	205,50	231,53	59.308	4.739
2001	221,44	202,11	70.723	4.986
2002	256,89	249,14	91.767	7.087
2003	290,20	273,76	102.379	5.175
2004	272,15	278,71	93.108	5.610
2005	250,95	269,22	68.333	3.903
2006	251,82	298,80	77.211	4.546
2007	237,66	241,27	75.671	3.782
2008	264,84	303,39	80.409	4.777
2009	273,04	309,16	88.291	4.878
2010	312,09	334,40	107.827	5.514
2011	309,74	341,91	103.138	4.533

Analizando los datos estadísticos del sector apícola español **a nivel regional**, vemos que Castilla-La Mancha en 2011 ocupó el 5º lugar, tanto en nº de colmenas (176563), como en producción de miel (2677 t), después de Andalucía, Extremadura, Comunidad Valenciana y Castilla-León (figura II.4). Pero esta comunidad autónoma, aún no siendo la mayor productora de miel, tiene una producción importante y es un referente de calidad en este producto, principalmente por la conocida y valorada D.O.P. “miel de La Alcarria”, que tiene una baja pero excelente producción.

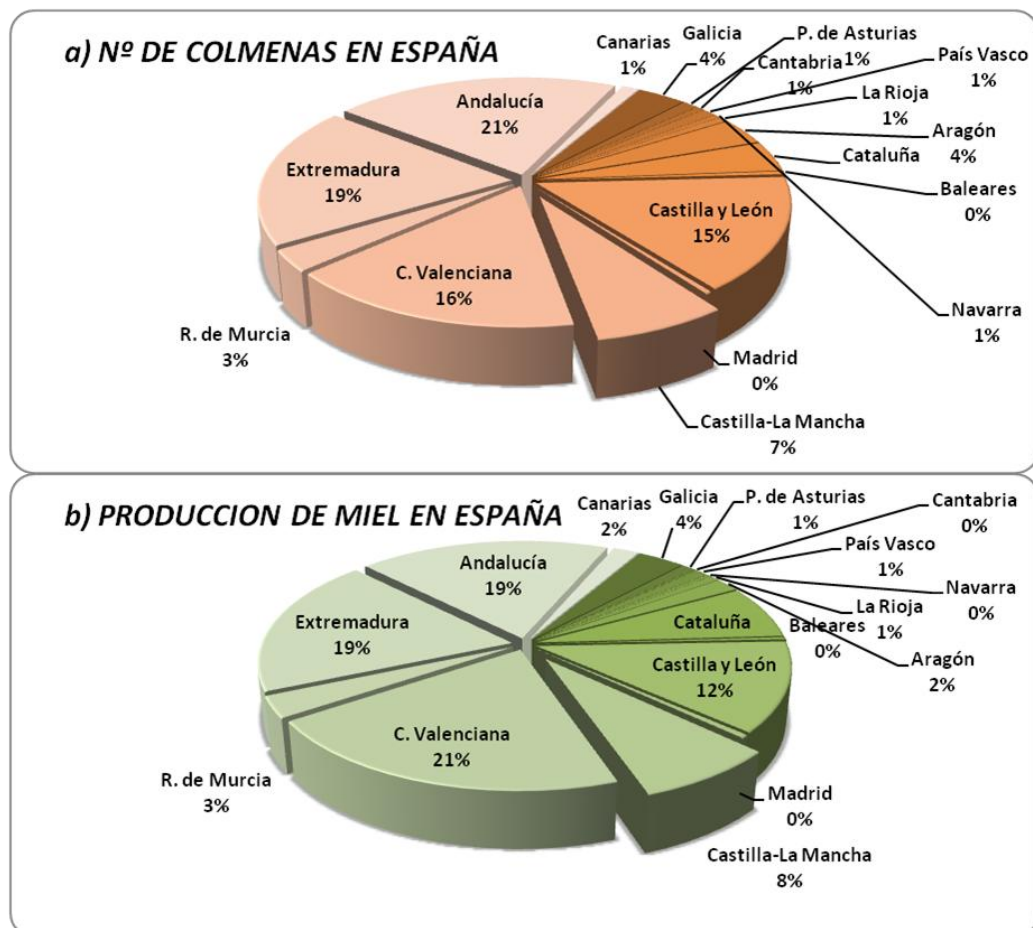


Figura II.4. La apicultura española por comunidades autónomas en cuanto al número de colmenas (a) y a la producción de miel (b). Fuente: Subdirección General de Estadística, 2011.

El número de explotaciones apícolas que hay registradas en esta región es, a fecha 1 de Abril del 2012, de 1716, lo que supone un 7% del conjunto español. De estas explotaciones solo el 21% (361) son profesionales, el resto no están registrados, lo que es un problema de cara a conocer en profundidad el sector. Estos apicultores tienen una cosecha media de 300/350 Kg, que no salen al mercado normalizado, se dedican al autoconsumo y a la distribución en pequeños mercadillos temporales.

En cuanto al número de colmenas, en 2011 se registraron en total 172594 colmenas en Castilla-La Mancha, 3969 colmenas más que el año anterior. **Por provincias**, donde más colmenas registradas hay es en Cuenca con 53500 colmenas, seguido de Albacete, Guadalajara, Ciudad Real y, por último, Toledo con 23559 colmenas declaradas (figura II.5). La mayor parte de las colmenas registradas en Castilla-La Mancha son del tipo movilista con un 90% del total de las colmenas, frente a las de tipo fijista, habitualmente de un menor rendimiento productivo.

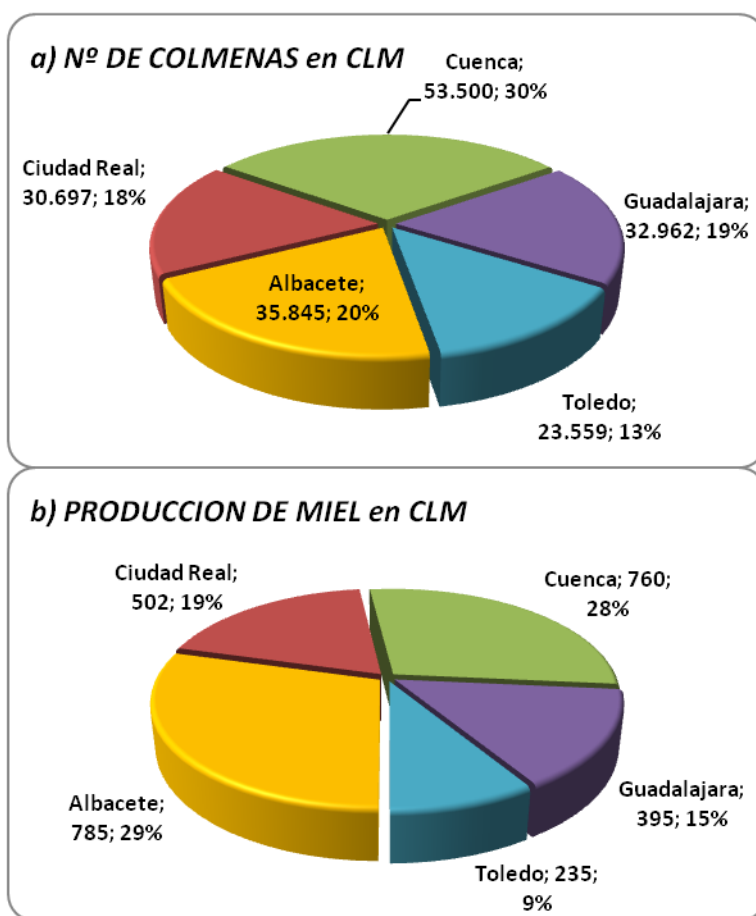


Figura II.5. La apicultura en Castilla-La Mancha en cuanto al número de colmenas (a) y a la producción de miel (en toneladas) (b) por provincia. Fuente: Subdirección General de Estadística, 2011.

La producción no sigue exactamente la misma tendencia. Así, aunque Albacete no es la provincia que mayor nº de colmenas tiene, es la que genera una mayor producción de miel de toda la Comunidad Autónoma con 785 toneladas, frente a Cuenca, con aproximadamente un tercio más de colmenas, pero que tiene una producción algo más baja, 760 t. Con 502 t les sigue la provincia de Ciudad Real, con 395 Guadalajara y, la de menor producción, Toledo, con 235 toneladas de miel (figura II.5).

En cuanto a la cera, la producción total fue de 107 toneladas, cuya distribución provincial seguía un perfil similar al del nº de colmenas: Cuenca produjo 30 toneladas, Albacete 29, Ciudad Real 28, Guadalajara 13 y Toledo 7 toneladas [Subdirección General de Estadística, 2011].

1.2. La caracterización botánica y geográfica de mieles producidas en Castilla-La Mancha

Las características esenciales que hacen que una miel incremente su valor comercial son: la monofloralidad; pertenecer a una denominación de calidad como son las Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.), las Indicaciones Geográficas Protegidas (I.G.P.), entre otras marcas de calidad o certificados; que a la miel se le haya dado algún tipo de tratamiento especial (miel biológica, ecológica, orgánica); y por último y, siendo básico de cara a comercializar una miel de calidad, la ausencia de residuos y garantía de trazabilidad.

La apicultura en Castilla-La Mancha, en el caso de la miel de la Alcarria, al menos, con denominación de origen propia, genera riqueza y empleo e incluso, puede considerarse una seña de identidad de esta tierra. Dentro de los Alimentos de Calidad Diferenciada de esta región, la miel es una de las de menor representación, existiendo únicamente la citada D.O.P. en este producto, al igual que ocurre con el “Azafrán de la Mancha” o el “Queso manchego”, junto con las I.G.P. “Ajo Morado de las Pedroñeras”, “Berenjena de Almagro”, “Cordero Manchego”, “Mazapán de Toledo”, “Melón de la Mancha” y “Pan de Cruz”. En cambio, en productos como el aceite de oliva existen 4 D.O.P. establecidas y en vinos 8 D.O.P. La miel producida en otras comarcas de Castilla-La Mancha podría explotarse más, de igual manera que el vino y el aceite, si el sector de la zona en cuestión estuviese interesado, ya que una D.O.P. o I.G.P.

incrementa el valor comercial del producto, como ya comentamos. Uno de los objetivos marcados en esta tesis es conocer con mayor profundidad las mieles producidas en esta región de cara a ayudar al sector apícola castellano manchego.

1.2.1. Antecedentes de la caracterización botánica y geográfica de mieles.

Que una miel nunca sea exactamente igual a otra miel, incluso mieles producidas en la misma colmena, es debido a que las abejas tienen una gran variedad de fuentes nectaríferas y de mielada a las que acudir. Esto que pudiera ser un problema, se puede revertir, bien dirigido, en una buena oportunidad de mejora del valor comercial de la miel, resaltando que en función del origen botánico (y en ocasiones también geográfico) una miel tendrá una u otras propiedades nutricionales y/o funcionales. De hecho, las mieles monoflorales están mejor valoradas que las de mezcla, y frecuentemente tienen un precio mayor. En países como Italia, España o Francia casi la mitad de las mieles puestas en el mercado vienen etiquetadas según su origen botánico. Por su puesto esta denominación debe ser verificable, para proteger al consumidor y preservar la reputación de las denominaciones, pero esto no es sencillo. No hay criterios ni límites legales específicos para el gran número de mieles monoflorales que existen; la legislación sobre miel solo distingue entre mieles florales en general, y mielatos [Codex Alimentarius, 2001; DOUE L 10/47 de 12 de enero de 2002], por lo que no hay una garantía de control eficiente de las denominaciones de origen.

La estrategia clásica que se ha seguido para solventar el problema de verificar una miel monofloral ha sido, el tener en cuenta las 3 metodologías utilizadas habitualmente en el análisis de mieles de forma complementaria: el análisis sensorial, el melisopalinológico y las determinaciones físico-químicas. Entre los 3 grupos de datos, se dibuja un modelo de referencia de cara a identificar el origen botánico de una miel, que no es rígido, cada zona geográfica puede tener sus peculiaridades. De ahí la importancia de estudiar el origen botánico junto al geográfico de una miel [Persano Oddo & Bogdanov, 2004].

Hay que tener en cuenta que el análisis más determinante para la determinación del origen botánico es el melisopalinológico que tiene cierta complejidad, laboriosidad y requieren un personal altamente cualificado [Benedetti et

al., 2004]. Con el objetivo de certificar el origen botánico de una miel este tipo de análisis debe ser complementado con los otros (sensorial y fisicoquímicos). Finalmente, a pesar de que esta estrategia de diagnóstico es bastante laboriosa y requiere de personal especializado, es hasta la fecha, el método inevitable por su precisión en la identificación de la mayoría de las variedades de miel [Persano Oddo & Bogdanov, 2004].

De esta forma, la caracterización geográfica y botánica mediante la evaluación de componentes palinológicos, sensoriales y, sobre todo, físico-químicos, de cara a establecer rangos que determinen inequívocamente la monofloralidad de una miel, ha sido motivo de numerosas publicaciones en las últimas décadas y en todas las partes del mundo. Así, se han tipificado una gran variedad de tipos de mieles tan características como el país o región de producción [Singh & Bath, 1997; Al-Khalifa & Al-Arif, 1999; Terrab et al., 2002; Manresa González, 2005; Zandamela, 2008; Carvalho et al., 2009; Salonen, 2011].

A nivel europeo el estudio de mayor relevancia es el que describieron Persano Oddo & Piro [2004]. Este estudio tuvo su origen en el congreso de Apimondia celebrado en 1998, durante el cual, la Comisión Internacional de la Miel constituyó un grupo de trabajo formado por 28 investigadores especializados de 11 países distintos, con el propósito de recoger datos analíticos de las principales mieles monoflorales europeas y, a partir de ellos, elaborar las características físico-químicas, palinológicas y sensoriales de cada tipo de miel, extrayendo al mismo tiempo los criterios de calidad correspondientes. Para la caracterización se recogieron más de 61000 datos de 6719 muestras, seleccionándose los 15 tipos de miel con mayor abundancia de producción o relevancia comercial de Europa. Excepto la miel de viborera, que es una miel menos frecuente, la mayoría de las fuentes florales analizadas en esta trabajo están recogidas en el estudio de las principales mieles monoflorales europeas: romero, espliego (que aparece como lavanda), tomillo, castaño y mielato. Esta caracterización de las mieles europeas se tomó como referencia aquí, llevando a cabo su comparación con los resultados de las mieles producidas en Castilla-La Mancha, incidiendo con este estudio en la importancia del origen geográfico dentro de un mismo origen botánico.

Además de esta gran recopilación hay numerosos estudios particulares de caracterización de mieles en Europa. Dentro de estas caracterizaciones están las de

varias mieles monoflorales griegas, como la de tomillo (*Thymus capitatus*, especie de tomillo que no se da en España, en donde la principal especie es *T. vulgaris*), castaño, algodón, brezo, azahar, girasol, pino y mielato de abeto [Thrasylvoulou & Manikis, 1995]; 14 mieles monoflorales italianas, entre ellas: miel de castaño, miel de tomillo de la especie *T. capitatus* (como en las mieles griegas), mielato de abeto [Persano Oddo et al., 1995], y otras mieles de localizaciones muy concretas [Conti et al., 2007; Conti, 2000]; mieles lituanas mono y multiflorales [Kaškonienė & Venskutonis, 1998]; mieles de origen francés de castaño y lavanda entre otras variedades [Devillers et al., 2004]; mieles portuguesas [Silva et al., 2009]; y bastantes publicaciones de mieles españolas [Serra Bonvehí, 1989; Pérez-Arquillé et al., 1995; Serra Bonvehí & Ventura Coll, 1995; Seijo et al., 1997; Mateo & Bosch-Reig, 1998; Seijo et al., 1998; González Paramás et al., 2000; Serrano et al., 2004; Terrab et al., 2004; Nozal Nalda, 2005; Escuredo Pérez, 2012].

De cara a la caracterización geográfica y botánica de la miel de Castilla-La Mancha, sólo la producida en la región de la Alcarria ha sido ampliamente estudiada [Ortiz Valbuena & Silva, 1990; Ortiz Valbuena, 1992; Gil et al., 1995] colaborando muchos de estos estudios en el logro de conseguir para esta miel el rango de Denominación de Origen en el año 1992, siendo la primera que se implantaba en España y en Europa, y que serviría como impulso definitivo en el plano económico y de reconocimiento de la calidad del producto. Pero los límites físico-químicos propuestos para considerar una miel como miel originaria de la Alcarria no establecen discriminación entre origen botánico, es decir una miel de romero y otra de espliego solo se diferencian por el análisis polínico y en su caso el sensorial, pero los rangos de calidad físico-química individuales para cada origen botánico no fueron establecidos (en el pliego de condiciones de la D.O.P. se reflejan límites globales para todos los tipos de mieles). En este trabajo se pretende completar la información actual, dando a conocer los límites de los parámetros físico-químicos para cada tipo de miel monofloral.

Por otro lado, además de la caracterización “clásica”, en los últimos tiempos se ha intentado hacer este cometido más sencillo mediante la búsqueda de marcadores florales para las mieles monoflorales, basados en la composición química de la miel. Así se han encontrado marcadores del tipo compuestos volátiles [Alissandrakis et al., 2007; Odeh et al., 2007; Castro-Vázquez et al., 2009; Aliferis et al., 2010; Castro et al.,

2010], ácidos fenólicos y flavonoides [Ferrerres et al., 1992; Ferreres et al., 1993; Andrade et al., 1997a; Andrade et al., 1997b; Martos et al., 2000; Gheldof et al., 2002; Yao et al., 2004a; Yao et al., 2004b], carbohidratos [Cotte et al., 2004a; Sanz et al., 2004; de la Fuente et al., 2005; de la Fuente et al., 2007a; de la Fuente et al., 2007b], aminoácidos y proteínas [Hermosín et al., 2003; Cotte et al., 2004b; Iglesias et al., 2004] principalmente. Kaškonienė & Venskutonis [1998] que hicieron una revisión bibliográfica de los marcadores florales propuestos para identificar mieles monoflorales en las 2 últimas décadas, demostraron que actualmente es bastante difícil establecer marcadores químicos fiables a la hora de discriminar entre mieles de diferente origen floral, ya que la composición química depende de numerosos factores, como son el origen geográfico, la temporada de cosecha, el almacenamiento, la especie de abeja e incluso la interacción entre los compuestos químicos y las enzimas presentes en la miel. De hecho, en la revisión bibliográfica que llevaron a cabo, vieron que para el mismo tipo de miel, se encontraban marcadores florales distintos. Se sugiere que la clasificación más fiable para varios tipos de miel, mejor que con un único compuesto, es usar grupos de compuestos (volátiles, compuestos fenólicos, aminoácidos y carbohidratos), siendo útil también incluir otros parámetros suplementarios tales como la conductividad eléctrica, el color y la actividad enzimática. A todos estos datos se les aplicarían diversas herramientas estadísticas, como un análisis multivariante, útiles tanto para la identificación como método de ayuda en el control de calidad de la miel.

1.2.2. Mieles monoflorales producidas en Castilla-La Mancha. Justificación de la elección de las mieles monoflorales estudiadas.

Mediante un estudio del informe histórico de entrada de muestras de miel para su análisis en el Laboratorio de Mieles del Centro Agrario de Marchamalo (donde se ha realizado la mayor parte de esta tesis doctoral), se evaluó que mieles monoflorales eran las de mayor interés en esta región, utilizando este histórico como reflejo de la producción y comercialización apícola, al no poseer otra fuente más fiable de producciones de mieles monoflorales a nivel regional.

Para la selección de los tipos de mieles y provincias de producción a estudiar, se eligieron únicamente las mieles monoflorales que hubieran tenido una entrada repetida, de al menos 20 muestras de la misma miel por provincia desde el año 1991

hasta 2006. Hay que tener en cuenta que este número, que en el conjunto puede parecer bajo, es debido a que las mieles monoflorales no son tan abundantes como las multiflorales.

En la tabla II.2 se muestran los datos de este histórico por tipo de miel y en la figura II.6 se representan de forma esquemática por provincia.

Según esto, se detallan a continuación cuales son los tipos de mieles de mayor producción en las diferentes provincias de Castilla-La Mancha.

Así, en la provincia de **Toledo**, las mieles de mayor producción son las de viborera (*Echium* spp.), castaño (*Castanea sativa* Mil.), brezo (Ericaceae), cantueso (*Lavandula stoechas* L.) y romero (*Rosmarinus officinalis* L.). Las mieles que se escogieron como más interesantes por su mayor producción fueron las de viborera y castaño, siendo este último tipo de miel muy apreciada por el consumidor y de producción única en toda Castilla-La Mancha.

En **Ciudad Real** las mieles con mayor frecuencia de aparición son las de viborera, romero, mielato y brezo. Para esta provincia únicamente se han seleccionado las mieles de viborera, cuya producción está garantizada casi todos los años.

En la provincia de **Cuenca** las producciones más relevantes son las de romero, espliego (*Lavandula latifolia* Medik.) y tomillo (*Thymus* spp.). Para todas ellas se ha estudiado, además de su caracterización, otras posibles propiedades nutritivas y funcionales.

Guadalajara, que es la provincia de mayor tradición apícola, aunque no la de mayor producción, como se constata en el apartado 1.1. de este capítulo, es, a su vez, donde se ha recogido mayor número de tipos diferentes de mieles. Por orden de producción: romero, espliego, mielato, cantueso, lavandín (*Lavandula angustifolia* x *latifolia*), tomillo, ajedrea (*Satureja montana* L.), viborera y brezo. Las mieles que se han estudiado en profundidad, debido a su producción anual garantizada han sido: romero, espliego, tomillo y mielato

Capítulo II. Caracterización de mieles monoflorales producidas en Castilla-La Mancha

De la provincia de **Albacete** sólo se recogieron muestras de miel de romero y azahar. El escaso y/o discontinuo número de muestras recibidas no dio lugar a incluir este tipo de mieles en este proyecto de tesis.

Tabla II.2. Histórico (1991 -2006) de entrada de mieles monoflorales al Laboratorio de Miel del Centro Agrario de Marchamalo.

TIPO DE MIEL	PROVINCIA	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total	Seleccionada
<i>Castaño</i>	Toledo			2				1		1						6		10	✓
<i>Mielato</i>	Ciudad Real														1	2	4	7	
	Guadalajara					1						4	4	8	1	9		27	✓
<i>Viborera</i>	Ciudad Real												5		3	3	18	29	✓
	Guadalajara								1					1			2	4	
	Toledo						2						2			4	17	25	✓
<i>Tomillo</i>	Cuenca								5		5			4	5	4	4	27	✓
	Guadalajara							5						5	5	5	3	23	✓
	Albacete			1														1	
<i>Espliego</i>	Cuenca				1	13		7	1			3		6	1			32	✓
	Guadalajara			7	1	6	3	5	17	8	25	8	1	2	3	1	11	98	✓
<i>Romero</i>	Albacete			3	1			2	1	1		2	1	3		47	1	62	
	Ciudad Real			1	1								1			10		13	
	Cuenca			2	5	1	1	30	18	1	1	29	28	2		2		120	✓
	Guadalajara	5		7	13		14	23	9	22	1	15	10		3	28	2	152	✓
	Toledo				1				1									2	
<i>Zarza*</i>	Guadalajara																9	9	
<i>Lavandín</i>	Guadalajara																7	7	
<i>Brezo</i>	Ciudad Real															3		3	
	Guadalajara	1											1				1	3	
	Toledo			1						1		1	1			1		5	
<i>Ajedrea</i>	Guadalajara														2		2	4	
<i>Cantueso</i>	Guadalajara							2	1				1	1	5	2		12	
	Toledo				1											4		5	
<i>Azahar</i>	Albacete													2		2	1	5	

*De las 9 muestras denominadas polínicamente como miel de zarza, 5 de ellas fueron identificadas organolépticamente como espliego o lavandín (con escaso contenido de polen, por lo que no se puede identificar palinológicamente). Además, el néctar de la zarza no tiene unas características organolépticas intensas que puedan ayudar a caracterizarla y diferenciarla de otros tipos de mieles, salvo en ciertas connotaciones saladas en el gusto.

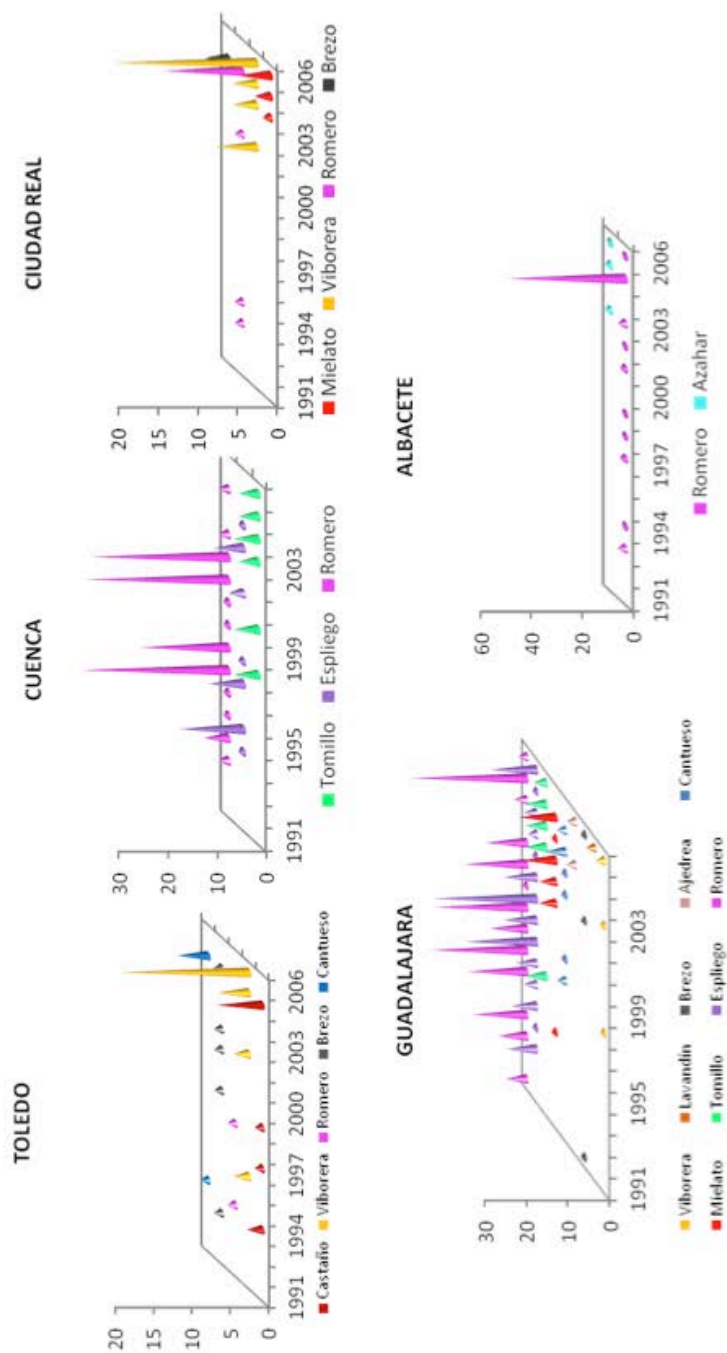


Figura II.6. Representación de las mieles monoflorales producidas en Castilla-La Mancha (Laboratorio de Mielles del Centro Agrario de Marchamalo)

1.2.3 Plantas responsables de las distintas producciones de miel de Castilla-La Mancha

Se entiende como flora apícola de una región al conjunto de especies vegetales de las cuales la abeja recoge néctar, polen y/o mielada, para la alimentación de la colmena. Al néctar (o mielada en su caso) le corresponde fundamentalmente el aporte nutritivo energético y, al polen el aporte nutritivo proteico, mientras que los propóleos son utilizados para otros usos no nutricionales en la colmena [Bueno Castellote, 1987]. Las abejas se ven muy atraídas por plantas ricas en sacarosa, con flores grandes e intensamente coloreadas, sobre todo con señales luminosas amarillas, azules y ultravioletas y con un gran número de flores abiertas [Robacker & Erickson, 1984; Ortiz Valbuena et al., 1996].

El **néctar**, es un líquido azucarado procedente del floema de las plantas y segregado a través de los nectarios, que son glándulas florales que pueden localizarse en la flor, ya sea en los pétalos o en los sépalos, o fuera de la flor (extraflorales), en las estípulas o en las hojas. Contiene de un 40% a un 80% de agua y del 7% al 60% de azúcares, minerales, aminoácidos, lípidos, proteínas, ácido ascórbico e, incluso, alcaloides [Jean-Prost, 1985; Herrera, 1989]. Constituye la materia prima de la miel [Bueno Castellote, 1987]. Las abejas evaporan el agua sobrante del néctar hasta alcanzar una concentración de azúcares del 80% sobre la que aportan algunas enzimas, consiguiendo un alimento de gran valor energético [Martínez Pozo, 2004].

El **polen** es el gameto masculino necesario para la fecundación de las plantas. Se encuentra en las anteras de los estambres de las flores. Las abejas obreras aglutinan los granos con saliva, miel o néctar y, durante el vuelo, los amasan con la ayuda de sus patas hasta confeccionar pequeñas bolitas que colocan en los cestillos de su tercer par de patas. Es el alimento imprescindible en la alimentación y desarrollo de las larvas, al ser muy rico en proteínas (11-35%). Además contiene glúcidos (en forma de azúcares o almidón, 20-40%), lípidos (1-20%), minerales, vitaminas, enzimas, resinas, flavonoides, carotenoides, entre otros componentes minoritarios. Su relevancia en la vida de las abejas es tan importante que se le ha denominado como “pan de abejas” [Jean-Prost, 1985].

La **mielada**, es un producto azucarado que proviene de la savia de árboles que ingieren, digieren y posteriormente excretan ciertos insectos, pulgones, gorgojos, hemípteros; también puede ser segregado por la propia planta a consecuencia de las picaduras de estos insectos. La mielada es utilizada por las abejas como “sucedáneo” del néctar cuando éste no es muy abundante [Bueno Castellote, 1987]. La producción de mielada no es constante, depende de la dinámica de población de los pulgones, de la planta huésped y de las condiciones del medio. Entre los árboles hospedadores más frecuentes en España figuran: álamos (*Populus spp.*), robles (*Quercus spp.*), sauces (*Salix spp.*), olmos (*Ulmus spp.*) y frutales, en general [Ortiz Valbuena et al., 1996].

En algunas plantas como la centaura (*Centaurea*) o algunas especies del género *Vicia*, existen nectarios extraflorales (en los foliolos) que pueden ser aprovechados por las abejas, sobre todo con tiempo seco y caluroso. Hay discrepancia de cómo encuadrar este tipo de fuente, si como mielato o como néctar floral. En cualquier caso, la significación real en la producción es muy pequeña, casi anecdótica. Serán las influencias meteorológicas, la propia abundancia, los periodos de escasez y el instinto de recolección, los factores que determinarán su significación real [Ortiz Valbuena et al., 1996].

Los **propóleos** son sustancias resinosas y aromáticas que las abejas recogen de las plantas superiores (como por ejemplo, el chopo) con fines profilácticos por sus propiedades fungicidas y bactericidas y de reparación en la colmena: tapar agujeros, recubrir paredes, fijar los paneles que impregna el interior de la colmena de un olor muy agradable.

A continuación se analizan concretamente las principales características de las plantas que proporcionan el carácter monofloral a las mieles estudiadas en este trabajo.

a.- El **romero** (*Rosmarinus officinalis* L.) es una planta vivaz, leñosa, subarborescente de ramas pardas de 0.5 a 1 m de altura, verde todo el año. Pertenece a la familia de las labiadas (Labiatae). Florece durante casi todo el año. Las flores son azul pálido y nacen en breves ramilletes floríferos en las axilas de las hojas con los tallos [Muñoz, 1996].

Prolifera en laderas y collados de tierra baja, mayoritariamente en los terrenos calcáreos. Se extiende abundantemente y de forma natural desde la costa hasta los 1500 m sobre el nivel del mar. Se da en la mayor parte de la península Ibérica, excepto en las comarcas del norte y noroeste de la península.

La esencia de romero se obtiene de las hojas y de las sumidades floridas en cantidades y composición variable, dependiendo del suelo y la época de recolección. Está compuesto, generalmente de α -pineno, canfeno, cineol, alcanfor de romero y borneol [Font Quer, 2003].

El interés apícola de esta planta, como ocurre con la mayoría de las labiadas, está en su rico contenido en néctar. La producción de polen es muy baja [Martínez Pozo, 2004]. La miel se cosecha en primavera, entre abril y junio, en la denominada cosecha del “temprano” o de “San Juan”, que aprovecha la floración temprana de frutales, aliagas, etc., y principalmente de romero [Ortiz Valbuena et al., 1996].

b.- El **espliego** (*Lavandula latifolia* Medik.) es una mata frondosa, con la base leñosa muy ramificada, con los tallos florales de forma cuadrada, terminando en una espiga formada por verticilos de 6 a 10 flores; la corola es de color azul o púrpura. Florecen desde finales de julio hasta finales de septiembre [Martínez Pozo, 2004]. Pertenecce a la familia de las labiadas y, en concreto, al género de las lavandas.

Se encuentra en las laderas y suelos pedregosos o rocosos, de naturaleza caliza o pardo caliza con horizonte húmedo muy poco desarrollado, pobres en materia orgánica, ricos en carbonatos y claramente básicos, con un pH comprendido entre 6.6 y superior a 8.4. La altitud óptima de crecimiento se da entre los 700 y los 1200 m.

Tienen preferencia por el clima mediterráneo semiárido, moderadamente cálido, seco o semiseco e inviernos tibios a frescos. Es una planta silvestre, muy extendida por las provincias de Burgos, Soria, Cuenca, Teruel, y Guadalajara [Bartolomé Esteban et al., 2002].

El aceite esencial tiene como componente mayoritario una cetona terpénica (tuyona), un amargo lactónico (marrubina) y flavonoides como el diosmósido y ácidos fenólicos (cafeico, clorogónico y rosmarínico) [Muñoz, 1996].

En cuanto al interés apícola, es muy similar a lo dicho para romero, tiene un alto contenido en néctar y aporta escaso polen. Las primeras mieles de espliego se extraen en septiembre, pero si las condiciones climatológicas son buenas, también se puede obtener algo de miel en octubre. Se recolecta en la denominada cosecha del “tardío” (de “verano” o de “San Miguel”), que aprovecha la floración de julio a septiembre [Ortiz Valbuena et al., 1996].

c.- El **tomillo**, es una mata pequeña de 10 a 40 cm de altura, aromática, vivaz y leñosa. Pertenece a la familia de las labiadas. Florece en primavera a partir del mes de marzo hasta finales de junio. Sus flores son pequeñas y pueden ser rosas o blancas, son axilares y agrupadas en la extremidad de las ramas [Martínez Pozo, 2004].

Es un arbusto originario de la cuenca mediterránea, donde constituye un componente de la vegetación perenne de las laderas pedregosas soleadas y secas. Se encuentra en collados, cabezos, laderas en tierras bajas calcáreas o arcillosas, y con mucha menor frecuencia en las silíceas. Puede encontrarse en una altitud entre 0 y 2000 m. Resiste bien las heladas y sequías, pero no el encharcamiento ni el exceso de humedad ambiente. Predomina en el este, centro y sur de la península Ibérica, así como en Baleares.

Las especies más frecuentes en la comarca de la Alcarria son *Thymus vulgaris* y *T. lacaitae*. Menos frecuentes en esta zona son otras especies como *T. zygis* y *T. mastichina*. Este género pertenece también a la familia de las labiadas [Bartolomé Esteban et al., 2002]

Los principales componentes de la esencia de tomillo son el timol y el carvacrol. La sumidades contienen flavonoides, derivados del apigenol y del luteolol; ácidos fenólicos, caféico, rosmarínico, clorogénico, ácidos triterpénicos, ursólico y oleanoico, además de saponinas y elementos minerales [Muñoz, 1996].

El interés apícola de esta planta, como para las otras labiadas, está en su rico contenido en néctar, siendo, sin embargo, escaso su contenido en polen [Martínez Pozo, 2004]. Esta miel se extrae tanto en la cosecha del “temprano” como en la del “medianil”, debido al largo periodo de floración de las múltiples especies de tomillo que proliferan en esta comarca.

d.- La **viborera** (*Echium vulgare* L.) es una planta herbácea espontánea perteneciente a la familia de las boragináceas, que puede alcanzar hasta un metro de altura, con uno o varios tallos muy erguidos que parten desde una roseta basal, y están muy cubiertos de ásperos pelos. Las flores tiene la corola azul o violeta con forma acampanada, de donde sobresalen de 4 a 5 estambres, que recuerdan a la lengua de una vibora [Martínez Pozo, 2004]. Florece de mayo hasta bien entrado el verano (agosto).

Crece en lugares no cultivados, ribazos, orillas de los caminos, etc., de todo la península Ibérica [Font Quer, 2003].

A causa de su floración tan prolongada en el tiempo, la extracción de esta variedad de miel se puede dar tanto en la cosecha del “temprano”, habitualmente en el “medianil” y, en ocasiones, también en el “tardío”. El interés apícola de esta planta está en su rico contenido en néctar y polen [Martínez Pozo, 2004].

e.- El **castaño** (*Castanea sativa* Miller) es un árbol de hoja caduca que alcanza fácilmente los 20 m de altura y gran longevidad, de tronco elevado y grueso. Es una especie de la familia de las fagáceas.

El castaño tiene flores muy poco aparentes y en un mismo ejemplar coexisten ambos sexos, tanto flores femeninas como masculinas; las femeninas crecen al pie del ramillete de flores masculinas. Florece entre mayo y junio. Por lo que la recolección de la miel de castaño se suele producir desde el mes de julio. El castaño es un gran alimento para las abejas ya que aporta tanto néctar, como abundante polen y mielada.

Se desarrolla en las tierras sin cal de toda la Península, mayoritariamente en las umbrías y sobre todo, en el norte y oeste, donde las lluvias son más frecuentes, desde el nivel del mar hasta los 1600 m, en Sierra Nevada. Este árbol crece asilvestrado en muchas comarcas de la península y en suelos síliceos o descalcificados. A menudo han sustituido a los robledales autóctonos [Font Quer, 2003].

f.- La **encina** (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) es un árbol de hoja perenne, de tamaño mediano. Las flores son unisexuales, las masculinas en racimos, colgantes (amentos) y las femeninas aisladas, de color amarillo o verdoso. Sus frutos son las

bellotas amargas, rodeadas en la base por una cúpula. Es justo en la unión de esta con la bellota donde se produce de forma espontánea la segregación de los mielatos [Martínez Pozo, 2004]. Florece en primavera y las bellotas maduran a finales de verano o en otoño.

Crece en toda la península, pero las diversas especies ocupan áreas bien delimitadas, generalmente. La encina, árbol típico mediterráneo se desarrolla en todas aquellas comarcas peninsulares de clima seco, hasta cerca de los 2000 m de altura en Sierra Nevada, pero se enrarece mucho en el oeste y noroeste del país

El interés de las abejas por esta planta está su polen y en los mielatos que segrega. Sus flores no excretan néctar [Martínez Pozo, 2004]. Hay que comentar que aunque solo se habla de la encina, otras especies de *Quercus* que se desarrollan en esta zona, como el quejigo (*Quercus faginea*) y la coscoja (*Q. coccifera*) también son fuente de mielada. En la cosecha más temprana aporta polen a la miel y en la más tardía produce mielato espontáneo.

1.2.4. Zonas geográficas de interés apícola castellano manchegas.

En este apartado se describen las zonas geográficas concretas donde se han producido las mieles seleccionadas para llevar a cabo este estudio: la Sierra de San Vicente, donde se produce la miel de castaño y, la Alcarria, de donde se extraen las mieles de romero, espliego y tomillo. Las ubicaciones de producción del resto de mieles seleccionadas (viborera y mielato) no son muy específicas, repartiéndose este tipo de producciones por varias localizaciones de las tierras castellano-manchegas.

1.2.4.1. LA SIERRA DE SAN VICENTE

La comarca de la Sierra de San Vicente la configuran varios pueblos de llanura y de montaña, pueblos que se encuentran ubicados de forma radial en torno a la misma sierra. Almendral de la Cañada, Buenaventura, Hinojosa de San Vicente, El Real de San Vicente, son alguno de los pueblos de esta comarca de importante tradición apícola.

SITUACIÓN GEOGRÁFICA.- La Comarca de la Sierra de San Vicente se sitúa en la parte noroeste de la provincia de Toledo, encuadrada entre los valles del Tiétar (norte) y del Alberche (sur), afluentes ambos del río Tajo; al este tiene continuidad, a través

de modestas entidades montañosas, con las primeras elevaciones de la Sierra de Guadarrama. Mientras que al oeste termina abruptamente por encima de la Fosa del Tajo. Se sitúa en el límite provincial con Ávila (Castilla-León) y Madrid (figura II.7).



Figura II.7. La Sierra de San Vicente.

OROGRAFÍA E HIDROGRAFÍA.-La Sierra de San Vicente es una elevación montañosa de dirección suroeste-noreste. Se configura como un fragmento de transición entre la Sierra de Gredos y la Fosa del Tajo, por lo que su relieve coincide con el de este macizo montañoso. El cerro más alto, denominado Cerro de las Cruces, tiene una altitud de 1373 m.

En cuanto a los relieves litológicos en las laderas de la Sierra de San Vicente, es destacada la presencia de rocas graníticas con diversas características morfológicas y en zonas arcillosas, condicionadas en parte por la litología pero también por una rápida erosión en las laderas, se configuran acarcavamientos, regueros, barrancos o badlands.

Desde el punto de vista hidrográfico, la Sierra de San Vicente pertenece a la cuenca del río Tajo, estando delimitada por dos de sus afluentes principales, al sur el río Alberche y al norte, el río Tiétar. Este último con varios afluentes que recorren la Sierra, como el Guadyrbas y Torinas. La ladera sur de la sierra está salpicada de innumerables arroyos [Mancomunidad de Servicios de la Sierra de San Vicente].

CLIMATOLOGIA.- Se encuentra entre las zonas de mayor pluviometría de Castilla la Mancha. Su situación entre los ríos Alberche y Tiétar y la Sierra de Gredos ha favorecido estos niveles de pluviosidad. Las temperaturas, aunque existen matices en función de la altura, no sufren variaciones extremas: inviernos suaves y veranos agradables son la característica principal [Mancomunidad de Servicios de la Sierra de San Vicente].

SUELO Y VEGETACIÓN.- el sustrato geológico sobre el que se desarrollan y del que toman los nutrientes son, por lo general, rocas de carácter ácido (granitos, esquistos y cuarcitas), a excepción del paraje de “Los Caleros” (Garciotún), donde aparecen rocas calizas.

Desde el punto de vista medioambiental la Sierra de San Vicente se caracteriza por su riqueza paisajística, su gran biodiversidad y el buen estado de conservación de sus ecosistemas, como resultado de la interacción de múltiples factores, como la climatología y la orografía, principalmente. La vegetación de esta serranía toledana se configura como un verdadero oasis paisajístico que contrasta con la gran llanura manchega. En pocos kilómetros se producen grandes variaciones de temperatura, pluviosidad, orientación (solana y umbría) y pendiente. Estos cambios generan condiciones ecológicas muy heterogéneas que acogen especies y formaciones vegetales de lo más variado, así se han llegado a catalogar más de 1000 especies, el 10% de las cuales son endemismos de la Península Ibérica [Mancomunidad de Servicios de la Sierra de San Vicente].

Vegetación arbórea: En las zonas menos elevadas de esta serranía se desarrollan los bosques típicamente mediterráneos: encinares (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) y alcornocales (*Q. suber*). En las zonas más altas, en las laderas de los cerros de un ambiente más fresco y húmedo, surgen los bosques caducifolios, cuya especie más frecuente es el melojo (*Quercus pyrenaica*), destacando por ser uno de los melojares más extenso y mejor conservado del Sistema Central, que se acompaña de castaños (*Castanea sativa*), fresnos (*Fraxinus angustifolia*), cerezos silvestres (*Prunus avium*), nogales (*Junglans regia*) y majuelos (*Crataegus monogyna*) de porte arbóreo. En zonas de proximidad de cauces de agua aparecen los bosques de ribera: fresnedas, saucedas (*Salix spp.*), alisedas (*Alnus glutinosa*), tarayales (*Tamarix spp.*), etc.

Zonas de matorral: Debido a la degradación de los bosques por diversos factores, han aparecido diversos tipos de matorrales. En las zonas de dehesa, donde antiguamente existía el bosque mediterráneo, se desarrollan retamales (*Retama sphaerocarpa*), escobonales (*Cytisus scoparius*), cantuesares (*Lavandula angustifolia* subsp. *pedunculata*) y tomillares de mejorana de monte o tomillo blanco (*Thymus mastichina*). En zonas más elevadas donde antiguamente había melojos, aparecen los jarales de jara pringosa (*Cistus ladanifer*) acompañados de cantueso, botoneras (*Santolina rosmarinifolia*), jaguarcillos (*Halimium umbellatum*), piornos (*Genista cinerascens*) y escobones. En zonas de umbría aparecen especies de ámbito centro-europeo como acónitos (*Aconitum napellus*), azucenas silvestres (*Lilium martagon*), helechos (*Athyrium filix-femina*) o acebos (*Ilex aquifolium*).

Zonas de cultivo: El castaño es una especie introducida por la mano del hombre desde tiempos remotos posiblemente. En la actualidad se trata de una especie perfectamente adaptada a las condiciones de estos bosques. También introducidos, pero en una época mucho más reciente, aparecen pinares de repoblación de pino resinero (*Pinus pinaster*) y pino silvestre (*P. sylvestris*). Estos pinares arrebataron el terreno al roble melojo, que hoy día se resiste a abandonar su territorio, y brota en el sotobosque de estos pinares. En las laderas más antropizadas nos encontramos con olivares, viñedos, cultivos de frutales y pequeños huertos de hortalizas [Mancomunidad de Servicios de la Sierra de San Vicente].

1.2.4.2. LA ALCARRIA

La Alcarria goza de popularidad debido a su inconfundible paisaje antropizado, marco contextual de célebres obras literarias entre las que destaca fundamentalmente *Viaje a la Alcarria* de Camilo José Cela. El nombre de Alcarria proviene del árabe y viene definido en el Diccionario de la Real Academia de la Lengua como “terreno alto y, por lo común, raso y de poca hierba”, defición que nos aproxima bastante a las características físicas de la comarca [Real Academia Española, 2001].

Como productos destacados de la tierra habría que mencionar la miel de la Alcarria, el espleigo y el cordero de raza alcarreña, aunque también serían dignos de mencionar sus vinos, con una reciente denominación de origen: Mondéjar.

La calidad de la miel de la Alcarria es conocida desde el siglo XVII. El aprovechamiento apícola tiene una arraigada tradición y destacada presencia por toda la comarca, sobre la que se establecen un gran número de colmenares estantes, en su mayoría pequeñas explotaciones muy repartidas por todo el territorio alcarreño [Martínez Pozo, 2004]. En 1985, se inician en el Centro Regional Apícola de Castilla-La Mancha los primeros estudios encaminados a conocer las características de la miel de la Alcarria y determinar su origen geográfico.

SITUACIÓN GEOGRÁFICA.- La Alcarria es una comarca natural situada en el centro de la península Ibérica al noroeste de la Submeseta Sur, que comprende la mayor parte de la provincia de Guadalajara (excepto el norte y el este de la provincia), el noroeste de Cuenca y una pequeña zona del sureste madrileño (figura II.8). Tiene como límite occidental: el Sistema Central y el Jarama; como límite norte la Sierra Ministra (NO) y el río Henares (NE); al sur y este limita con la comarca geográfica de la Mancha en la provincia de Cuenca. En el pliego de condiciones de la D.O.P. Miel de la Alcarria se reseñan todos los pueblos encuadrados en esta comarca [BOE nº 299 de 9 de diciembre de 2010].

OROGRAFÍA E HIDROGRAFÍA.- Es una meseta elevada entre los 900 y 1000 m, atravesada por ríos de pequeño caudal que han dado lugar a vegas y gargantas en cuyas laderas abundan plantas aromáticas y matorrales. Las vegas están a una altitud entre 700 y 800 m y de ellas, la del río Tajuña, divide en dos la comarca. Esta comarca está cruzada de noreste a suroeste por los ríos Tajo y Henares y atravesada de norte a sur por la sierra de Altomira.

CLIMATOLOGÍA.- El clima es mediterráneo continentalizado. La temperatura viene determinada por la altitud, el relieve y la topografía en cada punto de la comarca. La temperatura media anual, acorde con un clima meso-mediterráneo, es de 13 °C. Las temperaturas máximas se dan entre los meses de julio y agosto, la media de las máximas es de 32.3 °C y las mínimas se alcanzan entre los meses de diciembre-enero, siendo la temperatura mínima media de -0.9 °C. Estos contrastes térmicos dejan entrever el grado de continentalidad del clima de la Alcarria.



Figura II.8. Comarca de la Alcarria

En cuanto a la pluviometría, la media global de precipitaciones anuales es de 571 mm. Existe un mínimo de precipitaciones en los meses de julio y agosto, mientras que los máximos se producen en primavera, mayo-junio, y en otoño-invierno, octubre-diciembre, características que indican un acusado carácter estacional. Es típico del verano con días largos y fuerte radiación solar el sufrir una frecuente actividad tormentosa [Ortiz Valbuena et al., 1996]. Estos datos reflejan una pluviometría baja, lo que potencia una miel de baja humedad, sobre todo, en la cosecha del tardío tras 2 meses, julio y agosto, de intenso calor y bajas precipitaciones.

SUELO Y VEGETACIÓN.- El suelo de la Alcarria, de forma general, es básico de naturaleza margo-yesífera. La geomorfología de esta comarca denota un notable contraste entre los encinares y la agricultura de secano del páramo, y las pequeñas huertas, los olivares y las hierbas aromáticas de las cuestas y valles. Precisamente, la abundancia de plantas aromáticas como el romero, el tomillo, el espliego y la ajedrea es la combinación que hace posible la afamada miel de la Alcarria [Collazos Padrino y Gómez Romero, 2010].

Vegetación arbórea: de forma muy sintética podríamos decir que la vegetación arborea natural de esta comarca estaría dominada por encinares y quejigares (*Quercus faginea*) sobre suelos básicos y de yesos, alternando con matorrales de coscoja (*Quercus coccifera*) sobre los suelos más descarnados. Son, posiblemente, este tipo de bosques los que han sido más maltratados por el hombre, al menos, en los ambientes

más llanos por la proliferación de la agricultura de secano [Bartolomé Esteban et al., 2002]. El interés apícola de la encina y el quejigo es similar y se centra en el aprovechamiento polínico en los meses de floración (abril-mayo) y en el aprovechamiento de los mielatos (julio-septiembre).

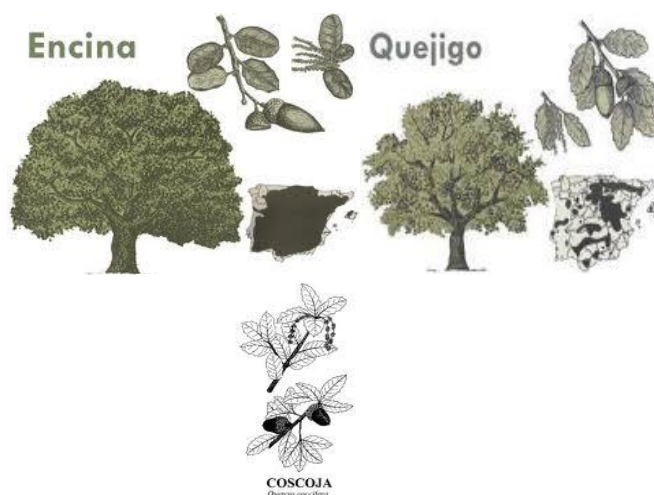


Figura II.9. Árboles del género *Quercus* que crecen en la zona de la Alcarria.

Las orillas de los ríos alcarreños están cubiertas por dos tipos de árboles, las choperas (*Populus spp.*) y los sauces (*Salix spp.*), cuyo aprovechamiento apícola se produce en primavera fundamentalmente, como fuente de polen y néctar, y de propóleos, en el caso de los chopos [Ortiz Valbuena et al., 1996].

Zonas de matorral: coexisten matorrales basófilos (suelos básicos, con predominio de las margas, las calizas de páramo y las arcillas) y gipsófilos (yesíferos) que alternan en función de la naturaleza del sustrato. Con estos antecedentes se originan una gran variedad de matorrales y endemismos [Bartolomé Esteban et al., 2002].

Una de las características principales de la Alcarria es que se trata de una zona relativamente térmica, más templada que el entorno inmediato. Desde el punto de vista apícola, debido a esta termicidad, el periodo de floración comienza en el mes de febrero con *Rosmarinus officinalis*, seguido de *Globularia alypum*, y finaliza a finales de septiembre con *Lavandula latifolia* [Bartolomé Esteban et al., 2002].



Figura II.10. Zona de matorral gipsófilo típico de la Alcarria.

La flora silvestre de mayor interés apícola de la zona la compone la familia de las labiadas, que son las mas abundantes en los suelos básicos [Martínez Pozo, 2004]. Es un conjunto de especies nectaríferas por excelencia, muchas de ellas aromáticas. Son la base de la particular y apreciada miel de esta comarca, originando, además, la mayoría de las mieles monoflorales. Entre las más abundantes y características están el romero (*Rosmarinus officinalis*), el espliego (*Lavandula latifolia*), la ajedrea (*Satureja montana*), el hisopo (*Hissopus officinalis*), el tomillo vulgar (*Thymus vulgaris*), la mejorana (*Thymus mastichina* L. subsp. *mastichina*) y un endemismo de la zona de yesos, *Thymus lacaitae* Pau [Bartolomé Esteban et al., 2002]. Otras familias importantes son las leguminosas o fabáceas, con una especie representativa muy frecuente en esta comarca, la aliaga (*Genista scorpius*); de la familia de las ericáceas, la gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi*); de las compuestas, otra familia de gran interés apícola con varias especies de cardos y la siempreviva (*Helichrysum stoechas*); infinidad de especies de crucíferas y boragináceas, también aportan néctar a las mieles producidas en esta comarca.

También aparecen con frecuencia enebros (*Juniperus oxicedrus*) y alguna sabina (*J. thurifera*).

Zonas de cultivo: las tierras de cultivo de esta comarca se dedican a cultivos herbáceos, con alternancia cereal-girasol que, junto con cultivos leñosos como vides y olivos, y en menor proporción el almendro, ocupan en la actualidad el territorio.

También existen cultivos de plantas aromáticas y condimentarias, siendo el más importante el lavandín (*Lavandula x intermedia* o *L. angustifolia* x *latifolia*)

1.2.4.2.1. MIEL DE LA ALCARRIA



La miel de la Alcarria, reconocida oficialmente como Denominación de Origen Protegida en 1992, por la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha y posteriormente a nivel nacional [BOE nº270 de 11 de noviembre de 1993], ha sido la primera miel en Europa en contar con D.O.P.

Las mieles comercializadas con el sello de la D.O.P. “Miel de la Alcarria” son de 3 tipos: Multifloral, Espliego y Romero. Las especificaciones técnicas actuales, que tiene que cumplir una miel producida en la Alcarria para pertenecer a esta D.O.P. están reflejadas en la figura II.11 [BOE nº299 de 9 de diciembre de 2010].

Las mieles de tomillo no han interesado tradicionalmente por sus “desagradables” características sensoriales, olor a rancio intenso y retrogusto picante, no estando recogidas en la D.O.P. de la Miel de la Alcarria, pese a que su producción es abundante en esta comarca y que frecuentemente imprime su carácter sensorial a las mieles cosechadas en primavera-verano. Además de esto, tanto en el capítulo III como en el V de esta tesis, se desarrolla una particularidad de la miel de tomillo, que podría dotarle de una mayor importancia funcional y a su vez comercial, pudiendo ser relevante de cara a incluir esta miel en la D.O.P.

ANEXO	
Pliego de condiciones	
A. Nombre del producto.	
Denominación de Origen Protegida «Miel de La Alcarria».	
B. Descripción del producto.	
Miel: Sustancia natural dulce producida por la abeja « <i>Apis mellífera</i> » a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure.	
La miel protegida, se clasificará en los siguientes tipos:	
Miel monofloral de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).	
Miel monofloral de espliego (<i>Lavandula latifolia</i> Medicus).	
Miel multifloral.	
Además al envasar, presentará las siguientes características:	
1. Físico-químicas:	
Humedad: $\leq 17,5$ %.	
Hidroximetilfurfural: $\leq 15,0$ mg/kg.	
Acidez libre: $\leq 35,0$ meq/kg.	
Conductividad eléctrica: $\leq 0,62$ mS/cm.	
Colorimetría: $L^*10 \geq 55,0$; $-2,0 \leq a^*10 \leq +22,0$; $b^*10 \geq 74,0$.	
2. Meliso-palinológicas:	
Tipo de «Miel de La Alcarria»	Porcentaje de granos de polen
Monofloral de espliego.	Polen de espliego > 10 %.
Monofloral de romero.	Polen de romero ≥ 15 %.
Multifloral.	La suma de los porcentajes de granos de polen de tomillo (<i>Thymus</i> t.), ajedrea (<i>Satureja</i> spp.), romero y espliego será ≥ 5 %.
Además se deberán cumplir los siguientes requisitos:	
El porcentaje de granos de polen de la familia ericáceas (<i>Ericaceae</i>), exceptuando gayuba (<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> L. Sprengel), será ≤ 1 %.	
El porcentaje de granos de polen de jara pringosa (<i>Cistus ladanifer</i> L.) será ≤ 3 %.	
El porcentaje de granos de polen de cantueso (<i>Lavandula stoechas</i> L.) será ≤ 3 %.	
La suma de los porcentajes de granos de polen de plantas no ornamentales cultivadas en la zona de producción será ≤ 15 %, excluyendo los cultivos de plantas aromáticas.	
3. Características organolépticas. Las mieles deberán presentar las cualidades organolépticas propias del origen floral correspondiente, especialmente en cuanto a aroma y sabor.	
C. Zona geográfica.	
La zona de asentamiento de las colmenas, se localiza en el centro de la península, abarca diferentes municipios de la comarca agraria de La Alcarria, que se extiende por las provincias de Guadalajara y Cuenca.	
La superficie total de esta zona es de 10.354 km ² .	

Figura II.11. Pliego de condiciones que deben cumplir las mieles comercializadas con D.O.P. Miel de La Alcarria [BOE nº299 de 9 de diciembre de 2010].

2. OBJETIVOS

1. Ampliar el estudio sobre mieles monoflorales ya definidas como la de romero y espliego.
2. Estudiar y analizar los datos físico-químicos, sensoriales y polínicos de otras mieles monoflorales originarias de Castilla-La Mancha no descritas hasta el momento.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras de miel

Las muestras seleccionadas para la caracterización de las principales mieles monoflorales de Castilla-La Mancha son en total 81 mieles de 6 orígenes botánicos: espliego, romero, tomillo, viborera, mielato y castaño. Fueron obtenidas directamente de los apicultores quienes proporcionaron información sobre el lugar y fecha de producción de la miel (tabla II.3). El Nº de registro se refiere al código que se le asignó a la muestra a su entrada en el Laboratorio de Mieles. En esta memoria las muestras se refieren con una codificación propia, que consiste en la inicial del tipo de miel y el nº de muestra.

Todos los análisis rutinarios de calidad se realizaron en la primera semana de entrada al Laboratorio de Mieles del Centro Apícola Regional perteneciente a la Junta de Comunidades de Castilla La Mancha (JCCM). Una vez completados estos análisis, se guardaron las mieles en congelación para una óptima conservación, de cara a realizar posteriores análisis no rutinarios (vitaminas, antioxidantes, azúcares, etc.).

Tabla II.3. Datos de las muestras utilizadas para el estudio de caracterización de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

Tipo de Miel	Muestra	Nº de registro	Fecha de extracción	Localidad de producción	Provincia
Espliego	E1	s-7990	Agosto 2007	Arbeteta	Cuenca
	E2	s-8067	Septiembre 2008	El Vindel	Cuenca
	E3	s-8129	Septiembre 2008	Peñalén	Guadalajara
	E4	s-8132	Septiembre 2008	Jadraque	Guadalajara
	E5	s-7893	Agosto 2007	Verdelpino de Huete	Cuenca
	E6	s-7171	Julio 2007	Huete	Cuenca
	E7	s-7556	Septiembre 2007	Moratilla de los Meleros	Guadalajara
	E8	s-7600	Septiembre 2007	Alhóndiga	Guadalajara
	E9	s-7909	Septiembre 2008	Berninches	Guadalajara
Romero	R1	s-7222	Mayo 2007	Yebes	Guadalajara
	R2	s-8212	Mayo 2009	Sayatón	Guadalajara
	R3	s-8223	Mayo 2009	Irueste	Guadalajara
	R4	s-8231	Mayo 2009	Irueste	Guadalajara
	R5	s-8200	Mayo 2009	Mantiel	Guadalajara
	R6	s-7238	Mayo 2007	Huerta de la Obispalía	Cuenca
	R7	s-7452	Junio 2007	Valdecolmenas	Cuenca
	R8	s-7186	Mayo 2007	Escariche	Guadalajara
	R9	s-7181	Mayo 2007	Escariche	Guadalajara
	R10	s-7215	Mayo 2007	Valdeconcha	Guadalajara
	R11	s-7220	Mayo 2007	Horche	Guadalajara
Tomillo	T1	s-7442	Mayo 2007	Verdelpino de Huete	Cuenca
	T2	s-7443	Mayo 2007	Verdelpino de Huete	Cuenca

Tabla II.3. (continuación)

Tipo de Miel	Muestra	Nº de registro	Fecha de extracción	Localidad de producción	Provincia
	T3	s-8267	Mayo 2009	Buendia	Cuenca
	T4	s-8278	Mayo 2009	Barcinano	Cuenca
	T5	s-8359	Mayo 2009	Paredes de Melo	Cuenca
	T6	s-7176	Junio 2007	Gargoles	Guadalajara
	T7	s-7177	Mayo 2007	Saceda-Trasierra	Cuenca
	T8	s-7179	Junio 2007	Saceda-Trasierra	Cuenca
	T9	s-7180	Junio 2007	Saceda-Trasierra	Cuenca
	T10	s-7188	Mayo 2007	Escariche	Guadalajara
	T11	s-7231	Junio 2007	Villanueva de Alcorón	Guadalajara
	T12	s-7232	Junio 2007	Villanueva de Alcorón	Guadalajara
	T13	s-7233	Junio 2007	Villanueva de Alcorón	Guadalajara
	T14	s-7234	Junio 2007	Villanueva de Alcorón	Guadalajara
	T15	s-7235	Junio 2007	Villanueva de Alcorón	Guadalajara
	T16	s-7236	Junio 2007	Villanueva de Alcorón	Guadalajara
	T17	s-7237	Junio 2007	Villanueva de Alcorón	Guadalajara
	T18	s-7344	Junio 2007	Escamilla	Guadalajara
	T19	s-7165	Junio 2007	Vellisca	Cuenca
	T20	s-7172	Junio 2007	Valdecolmenas	Cuenca
	T21	s-7444	Mayo 2007	Verdelpino de Huete	Cuenca
	T22	s-7453	Junio 2007	El Vindel	Cuenca
	T23	s-7514	Agosto 2007	El Vindel	Cuenca
	T24	s-7527	Mayo 2007	Abia de la Obispalía	Cuenca

Tabla II.3. (continuación)

Tipo de Miel	Muestra	Nº de registro	Fecha de extracción	Localidad de producción	Provincia
	T25	s-8219	Mayo 2009	Canredondo	Guadalajara
	T26	s-7173	Junio 2007	Cuevas de Velasco	Cuenca
	T27	s-7174	Junio 2007	Langa	Cuenca
	T28	s-7175	Junio 2009	Barajas de Melo	Cuenca
	T29	s-8793	Mayo 2010	Moratilla de los Meleros	Guadalajara
	T30	s-8859	Junio 2007	Fuentelelencina	Guadalajara
	T31	s-8881	Junio 2007	Pastrana	Guadalajara
	T32	s-8915	Junio 2007	Pastrana	Guadalajara
Castaño	C1	s-1383	Agosto 1997	Almendral de la Cañada	Toledo
	C2	s-6286	Agosto 2005	Hinojosa de San Vicente	Toledo
	C3	s-6293	Agosto 2005	El Real de San Vicente	Toledo
	C4	s-6296	Agosto 2005	Almendral de la Cañada	Toledo
	C5	s-7375	Julio 2007	Hinojosa de San Vicente	Toledo
	C6	s-7376	Julio 2007	Hinojosa de San Vicente	Toledo
	C7	s-7667	Septiembre 2007	Hinojosa de San Vicente	Toledo
	C8	s-8103	Agosto 2008	Hinojosa de San Vicente	Toledo
	C9	s-8347	Julio 2009	Hinojosa de San Vicente	Toledo
	C10	s-8378	Julio 2009	Buenaventura	Toledo
	C11	s-6481	Julio 2005	Buenaventura	Toledo

Tabla II.3. (continuación)

Tipo de Miel	Muestra	Nº de registro	Fecha de extracción	Localidad de producción	Provincia
Viborera	V1	s-6507	Mayo 2006	Viso del Marqués	Ciudad Real
	V2	s-6588	Junio 2005	Mazarambroz	Toledo
	V3	s-7434	Mayo 2007	Fernancaballero	Ciudad Real
	V4	s-7805	Junio 2007	Hontanar	Toledo
	V5	s-7851	Junio 2008	Malagón	Ciudad Real
	V6	s-7872	Junio 2008	Hinojosa de San Vicente	Toledo
	V7	s-7884	Junio 2008	Almuradiel	Ciudad Real
	V8	s-7886	Junio 2008	Almuradiel	Ciudad Real
	V9	s-7887	Junio 2008	Villahermosa	Ciudad Real
	V10	s-7913	Junio 2008	Menasalbas	Toledo
	V11	s-7914	Junio 2008	Menasalbas	Toledo
	V12	s-8102	Agosto 2008	Hinojosa de San Vicente	Toledo
Mielato	M1	s-7701	Septiembre 2007	Malaguilla	Guadalajara
	M2	s-7702	Julio 2007	Puebla de Beleña	Guadalajara
	M3	s-7704	Agosto 2007	Puebla de Beleña	Guadalajara
	M4	s-7720	Agosto 2007	Cantalojas	Guadalajara
	M5	s-8088	Septiembre 2008	Cogolludo	Guadalajara

3.2. Parámetros físico-químicos de calidad

Los parámetros de calidad aplicados a estas mieles, son determinados según los métodos recogidos en la Orden del 12 de Junio de 1986, *por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para la miel* [BOE nº145 de 18 de junio de 1986]. Dichos métodos fueron plasmados, con mayor detalle, en los procedimientos del Laboratorio de Miel, que fueron los seguidos a la hora de hacer las diversas determinaciones. Se analizaron los siguientes parámetros: hidroximetilfurfural (HMF), humedad, acidez libre, pH y conductividad eléctrica.

3.2.1. Hidroximetilfurfural

El contenido en HMF se determina por medida de la absorbancia a 284 y 336 nm de una disolución previamente desproteinizada con disolución de Carrez. Se emplea como blanco otra disolución a la cual se le añade bisulfito sódico con el fin de eliminar la absorbancia debida al HMF.

INSTRUMENTACION.-

- Espectrofotómetro HITACHI U-1100 de haz simple.
- Cubetas de 1 centímetro de paso de luz.

REACTIVOS.-

- Solución Carrez I.- Disolver 7.5 gramos de ferrocianuro de potasio trihidratado $[K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O]$ (Panreac, Barcelona, España) en 50 mL de agua destilada. Para disolver, se calienta con agitación magnética a unos 40 °C. Se guarda en la oscuridad.
- Solución Carrez II.-Disolver 15 gramos de acetato de zinc dihidratado $[Zn(AcO)_2 \cdot 2H_2O]$ (Panreac, Barcelona, España) en 50 mL de agua destilada. Para ayudar a disolver, calentar hasta unos 40 °C. Se guarda en la oscuridad.
- Solución de sulfito ácido de sodio al 0.20%. Disolver 0.20 gramos de sulfito ácido de sodio ($NaHSO_3$) (Panreac, Barcelona, España) y diluir a 100 mL con agua destilada. En el caso de que la absorbancia a 284 nm sea mayor de 0.600, hacer una dilución (1:1) de la solución.

PROCEDIMIENTO.-

Pesar 5 g de miel (que no haya sido calentada), disolverla en unos 25 mL de agua destilada. Añadir 0.50 mL de solución Carrez I, mezclar, añadir 0.50 mL de la solución Carrez II, mezclar y diluir hasta 50 mL con agua destilada. Filtrar con papel de filtro y desechar los primeros 10 mL de filtrado.

En tubos de ensayo, pipetear 5 mL de los filtrados. Añadir a uno de los tubos 5 mL de agua (muestra) y al otro, 5 mL de la solución sulfito ácido de sodio al 0.2% (referencia). Mezclar bien y determinar la absorbancia de la solución de la muestra

frente a la de referencia a 284 nm y a 336 nm. Si la absorbancia es superior a 0.600, diluir la solución de la muestra con agua y la solución de referencia en la misma proporción con una solución de sulfito ácido de sodio al 0.1%. Leer nuevamente la absorbancia.

El contenido de hidroximetilfurfural expresado en mg por Kg de miel vendrá dado por la siguiente fórmula:

$$HMF \left(\frac{mg}{Kg} \right) = \frac{(A_{284nm} - A_{336nm}) * 5}{\text{peso de la muestra}} 149.7$$

En el método oficial [BOE nº145 de 18 de junio de 1986] las unidades vienen dadas en mg/100 g, así el factor constante del final de la fórmula, aparece como 14.97, pero como en la Norma actual los límites vienen dados en mg/kg, se expresan los valores de HMF en estas unidades, por lo tanto este factor viene multiplicado por 10 [BOE nº186 de 5 de agosto de 2003].

3.2.2. Humedad

La determinación del contenido en agua se realiza por ser un factor crítico de la calidad de este producto. El exceso de agua en su composición puede provocar la fermentación de la miel, convirtiéndola en no apta para el consumo.

Para la determinación de la humedad se mide el índice de refracción de la miel, a partir de la cual se ve la equivalencia con el porcentaje de humedad. El índice de refracción de un líquido es constante. Su determinación sirve como método para identificar y ver la pureza de una sustancia. Pequeñas cantidades de impurezas tienen un efecto importante en el valor experimental de dicho índice.

INSTRUMENTACIÓN.- El refractómetro utilizado es un ATAGO 1T con sonda interna de temperatura, acoplado a un baño termostático (SELECTA Ultraterm S-383).

PROCEDIMIENTO.- El ensayo se basa en la lectura del índice de refracción de la miel a 20°C y en el cálculo del porcentaje en agua (%p/p) mediante la correspondencia con las tablas de Chataway (revisadas por Wedmore a 20°C del índice de refracción), tabla II.4. Dichas tablas relacionan el índice de refracción con el porcentaje de agua, y

se construyeron haciendo un gráfico del logaritmo del índice de refracción menos la unidad, frente al contenido de agua de la miel, determinado por secado con aspiración.

Para la determinación del índice de refracción, las muestras de miel deben estar perfectamente homogeneizadas, líquidas y transparentes. Si la muestra no está totalmente líquida, se homogeneiza, y se introduce una porción en el frasco de vidrio cerrado y se mantiene en la estufa a 40°C durante 24 horas.

Una vez preparada la muestra se deposita una gota de miel en mitad del prisma primario del refractómetro. Bajar el prisma secundario, cerrar, comprobar que la temperatura está en 20 ± 0.1 °C (circula agua atemperada proveniente del baño termostático a través del refractómetro) y medir.

Una vez obtenido el dato del índice de refracción, se utiliza la tabla II.4 para convertir la lectura en contenido de humedad de la miel, expresado en tanto por ciento (p/p).

3.2.3. Acidez libre y pH

La miel contiene ácidos orgánicos libres y lactonas. Estas últimas originan los ácidos correspondientes cuando la miel se alcaliniza, constituyendo una potencial reserva de acidez.

No se determina la acidez lactónica por ser suficiente para tener una idea general de la acidez, la medición de la acidez libre. Además, esta última es la única que viene recogida en la norma de calidad de la miel [BOE nº186 de 5 de agosto de 2003].

La acidez libre se determina por valoración potenciométrica con álcali hasta pH 8.50.

Tabla II.4. Tabla de Chataway-Wedmore para la determinación del contenido de humedad

**TABLA DE CHATAWAY Y REVISADA POR WEDMORE
PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO
DE HUMEDAD**

Índice de refracción - 20 °C	Contenido de humedad - Porcentaje	Índice de refracción - 20 °C	Contenido de humedad - Porcentaje
1,5044	13,0	1,4966	16,0
1,5038	13,2	1,4961	16,2
1,5033	13,4	1,4956	16,4
1,5028	13,6	1,4951	16,6
1,5023	13,8	1,4946	16,8
1,5018	14,0	1,4940	17,0
1,5012	14,2	1,4935	17,2
1,5007	14,4	1,4930	17,4
1,5002	14,6	1,4925	17,6
1,4997	14,8	1,4920	17,8
1,4992	15,0	1,4915	18,0
1,4987	15,2	1,4910	18,2
1,4982	15,4	1,4905	18,4
1,4976	15,6	1,4900	18,6
1,4971	15,8	1,4895	18,8
1,4890	19,0	1,4810	22,2
1,4885	19,2	1,4805	22,4
1,4880	19,4	1,4800	22,6
1,4875	19,6	1,4795	22,8
1,4870	19,8	1,4790	23,0
1,4855	20,0	1,4785	23,2
1,4860	20,2	1,4780	23,4
1,4855	20,4	1,4775	23,6
1,4850	20,6	1,4770	23,8
1,4845	20,8	1,4765	24,0
1,4840	21,0	1,4760	24,2
1,4835	21,2	1,4755	24,4
1,4830	21,4	1,4750	24,6
1,4825	21,6	1,4745	24,8
1,4820	21,8	1,4740	25,0
1,4815	22,0		

PROCEDIMIENTO.- Se disuelven 10 g de miel en 75 ml de agua ultrapura. En agitación, sumergimos el electrodo del pH-metro y otro brazo con un termómetro calibrado. La temperatura tiene que ser de 25° C. Una vez alcanzado el equilibrio térmico, se efectúa la lectura de pH. A continuación, se valora con hidróxido de sodio 0.05 N a una velocidad constante de 5ml/min hasta llegar a un pH de 8.5. Se anota el volumen gastado. Se realiza además una corrección del blanco que consiste en el mismo proceso pero sin miel.

El valor de acidez libre se obtiene de acuerdo a esta ecuación:

$$Acidezlibre \left(\frac{meq}{kg} \right) = \frac{(Vb - Vo) * Nb * 1000}{p}$$

Nb = Normalidad de la base; Vb = Volumen gastado de la base; Vo = Volumen del blanco; p = peso de la muestra

3.2.4. Conductividad eléctrica

La determinación se basa en la medición de la resistencia eléctrica, siendo la conductividad el valor recíproco de la resistividad.

INSTRUMENTACIÓN.-

- Conductímetro RADIOMETER (CDM83) con célula electrolítica (CDC304)
- Baño termostático (SELECTA Ultrateerm S-383)

PROCEDIMIENTO.-

Es necesario conocer previamente el porcentaje de humedad de la muestra de miel para calcular el residuo seco y después el peso teórico de la muestra, correspondiente a una disolución del 20% (peso seco/volumen) de materia seca. Se pesan 10 g de miel y se diluyen hasta un volumen total de 50 ml, es decir el peso teórico de la muestra es equivalente a 10 g de extracto seco. Introducir el vaso en el baño termostático a 20° C. La lectura se efectúa cuando se alcance la temperatura (20 °C) y los resultados se expresan como mS/cm.

3.3. Colorimetría

3.3.1. Método colorimétrico CIELAB

El colorímetro empleaba un iluminante estándar D₆₅ que simula la luz del día incluyendo a la radiación ultravioleta y un tipo de observador 10°, capaz de simular el enfoque humano con la retina completa.

INSTRUMENTACION.-

- Espectrofotómetro HITACHI U-1100 de haz simple.
- Cubetas de 1 cm de paso de luz.

PROCEDIMIENTO.-

a.- Tratamiento previo de la muestra:

1.- Para medir en el espectrofotómetro, la muestra debe estar ausente de partículas en suspensión y transparente, para lo cual introducimos una pequeña cantidad de miel, previamente homogeneizada, en un tubo de vidrio provisto de tapón de rosca, se tapa y se introduce en la estufa a 40°C durante 24 horas.

2.- Si después del tratamiento en estufa, la miel no se ha licuado totalmente o no está totalmente transparente, quitar la espuma superficial con una micro espátula, calentar el tubo tapado en el microondas durante unos segundos (evitando que la muestra hierva) y posteriormente introducirlo en el baño de ultrasonidos para retirar burbujas. Eliminar de nuevo la espuma de arriba con una micro espátula y llenar inmediatamente la cubeta. Las medidas de color no se pueden realizar con la cubeta caliente ya que la medida de turbidez es más alta, hay que esperar a que se enfríe.

3.- En las mieles que una vez depositadas en la cubeta sigan estando turbias, centrifugar la cubeta envuelta en papel para que no se rompa durante 10 minutos a 2500 - 3000 r.p.m. Dejar la cubeta en reposo y en oscuridad durante 24 horas, antes de la medición.

b.- Medición espectrofotométrica y cálculos

Se llevó a cabo la medición espectrofotométrica, en valores de transmitancia, cada 5 nm desde 780 a 380 nm. Con estas medidas se calcularon las coordenadas tricromáticas (x_{10} , y_{10} , z_{10}) y a partir de estas, los parámetros colorimétricos del espacio tridimensional de color CIELAB para cada muestra: claridad (L^*_{10}), cromaticidad rojo/verde (a^*_{10}), cromaticidad amarillo/azul (b^*_{10}), croma ($C^*_{ab,10}$) y tono (h^*_{10}). Resultados según CIELAB, CIE (1986) n° 15.2; iluminante "D₆₅" (6504 K°) [CIE, 1986; Ortiz Valbuena, A., 1992]. En cada muestra se hallaron los valores triestímulo (X_{10} , Y_{10} , Z_{10}), mediante las fórmulas:

$$X_{10} = k_{10\lambda} \sum \phi_{\lambda}(\lambda) \underline{x}_{10}(\lambda) \Delta\lambda$$

$$Y_{10} = k_{10\lambda} \sum \phi_{\lambda}(\lambda) \underline{y}_{10}(\lambda) \Delta\lambda$$

$$Z_{10} = k_{10\lambda} \sum \phi_{\lambda}(\lambda) \underline{z}_{10}(\lambda) \Delta\lambda$$

Donde $k_{10\lambda}$ = constante; $\phi_{\lambda}(\lambda)$ = valores de la función estímulo de color; $\Delta\lambda$ = intervalo de longitud de onda; $\underline{x}_{10}, \underline{y}_{10}, \underline{z}_{10}$ = funciones del observador colorimétrico.

Las coordenadas tricromáticas ($x_{10} y_{10} z_{10}$) se calculan según:

$$x_{10} = \frac{X_{10}}{X_{10} + Y_{10} + Z_{10}}$$

$$y_{10} = \frac{Y_{10}}{X_{10} + Y_{10} + Z_{10}}$$

$$z_{10} = \frac{Z_{10}}{X_{10} + Y_{10} + Z_{10}}$$

Para el espacio tridimensional de color CIELAB:

$$L^*_{10} = 116 \sqrt[3]{Y/Y_n} - 16 \quad \text{para } Y/Y_n > 0.008856$$

$$a^*_{10} = 500 \left(\sqrt[3]{X/X_n} - \sqrt[3]{Y/Y_n} \right) \quad \text{para } X/X_n > 0.008856$$

$$b^*_{10} = 200 \left(\sqrt[3]{X/X_n} - \sqrt[3]{Y/Y_n} \right) \quad \text{para } Y/Y_n > 0.008856$$

$$C^*_{ab,10} = \sqrt{(a^{*2}_{10} + b^{*2}_{10})}$$

$$h_{ab,10} = \arctan(b^{*2}_{10}/a^{*2}_{10})$$

Todos estos cálculos se realizan con un programa informático específico del Laboratorio de Mieles del Centro Agrario de Marchamalo que se encarga de calcular los resultados a partir de las transmitancias capturadas del espectrofotómetro.

3.3.2. Método colorimétrico PFUND

El color también fue determinado con el método Pfund, que utiliza un graduador de color Lovibond. Este método colorimétrico lleva aparejado un dato más subjetivo que el obtenido por el método CIELAB, ya que el resultado depende del criterio del observador. La ventaja es que es más fácil de interpretar y comparar. Los

resultados se expresan como unidades de mm de Pfund. Para eliminar, en parte, la subjetividad del resultado, las medidas se realizan por 3 operadores y el valor de Pfund es la media de los 3 datos.

INSTRUMENTACION.-

- Graduador de color Pfund (Lovibond® Visual Comparator 2000 Series) (figura II.12).

PROCEDIMIENTO.- La muestra depositada en la cubeta que se ha utilizado para medir el color CIELAB, se utiliza también para este sistema. Se introduce la cubeta en el graduador y se compara visualmente con los filtros de diferentes tonalidades de ámbar, cada tonalidad lleva aparejada un número en mm de Pfund.



Figura II.12. Graduador de color Lovibond®

Aunque el color de la mayoría de las muestras fue determinado con el comparador Lovibond®, los datos reflejados en este estudio provienen del parámetro X_{10} , un parámetro preciso y no dependiente de la subjetividad del operador, ver apartado 4.3.2.

3.4. Melisopalinología

La miel contiene en suspensión una serie de elementos microscópicos: polen, esporas de hongos, etc. El estudio del sedimento, obtenido por centrifugación de la muestra, permite conocer datos precisos sobre las diferentes especies vegetales que fueron visitadas por las abejas durante el pecoreo, conociendo así el origen botánico y,

80

en ocasiones, también el geográfico, además del estado de conservación de la miel. Para el estudio de la composición botánica se siguen los métodos clásicos de la especialidad, descrito por Louveaux et al. [1978], actualizado por Von der Ohe et al. [2004].

INSTRUMENTACION.-

- Microscopio Leitz Laborlux (Hampshire, Reino Unido) con micrómetro incorporado.
- Balanza analítica Sartorius (Madrid, España) mod. 1801 con precisión de 0.1 mg.
- Agitador termomagnético Selecta (Barcelona, España) mod.243.
- Centrífuga Selecta Clements 2000.
- Placa calefactora termorregulable Selecta Preciplac.
- Portaobjetos de 76×26 mm de borde redondeado y esmerilado, y cubreobjetos de 24×36 mm de Menzel-Gläser (Braunschweig, Alemania).
- Tubos de centrifuga de 10 ml graduados.
- Placa Petri de plástico.

REACTIVOS.-

- Etanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ácido sulfúrico (Panreac, Barcelona, España)
- Gelatina (Riedel-de Haën, Hannover, Alemania)
- Glicerina bidestilada (Panreac, Barcelona, España)
- Ácido fénico (Panreac, Barcelona, España)

- Solución de glicero-gelatina fenicada: se disuelven 7 g de gelatina en polvo en 40 mL de agua destilada. Dejar reposar un mínimo de 2 horas para permitir el hinchamiento de la gelatina. Llevar a un agitador termomagnético regulado a 36° C, y en agitación, añadir 50 mL de glicerina bidestilada líquida y 0.5 g de ácido fénico cristalizado. A continuación (y sin enfriar) se van llenando las placas Petri con la solución de gelatina con un espesor de 3 mm aproximadamente, se tapa dejando una rendija para que no se condense agua, y cuando están frías las placas, se cierra la tapa, se anota la fecha de preparación y se envuelven las placas en Parafilm®. Se guardan

en la nevera. Con las cantidades señaladas, se preparan unas diez placas Petri. La gelatina en nevera tiene una duración aproximada de 8 meses.

- Agua acidulada: Añadir unos 5 mL de ácido sulfúrico a unos 1000 mL de agua destilada, agitar.

PROCEDIMIENTO.-

a.- Preparación de las placas de polen:

Los portas y cubres se han de limpiar con alcohol antes de usarlos. Existen granos de polen frágiles, por lo que se cuidará de los movimientos bruscos en general. Disponer sobre la placa calefactora, regulada a unos 40°C los portas y cubres. Se pesan aproximadamente 5 g de miel previamente homogeneizada, se disuelven en 10 mL de agua acidulada con ayuda del termoagitador, a temperatura no superior a 40° C. Se centrifuga a 2000 r.p.m. durante 10 minutos, a continuación, se succiona el sobrenadante con pipeta automática hasta dejar aproximadamente 0,5 mL en cada tubo. Añadir a los tubos 10 mL de agua destilada y volver a centrifugar. El sobrenadante es nuevamente succionado con pipeta automática hasta dejar 1 o 2 mm de solución. Agitar para disolver y verter el contenido de los tubos en el cubreobjetos. Se espera hasta que se evapore el agua de la muestra de miel y entonces, se coloca una cantidad adecuada de glicero-gelatina fenicada cortada en tiritas sobre los portas. Cuando ésta se licua, se vuelca el cubre sobre el portaobjetos. Dejar la preparación en reposo boca-arriba durante unos 30 minutos, transcurrido este tiempo dar la vuelta a la preparación y dejar así unas horas, para que la capa de gelatina sea mínima y los granos de polen no aparezcan en diversos planos. Por último sellar los bordes de la preparación con laca de uñas.

b.- Identificación y conteo de los pólenes del sedimento: es necesario contar, al menos, 300 granos de polen para estimar las frecuencias relativas de los tipos polínicos. Para la observación bajo el microscopio se utilizan los objetivos desde 4x o 10x, en función de la necesidad de ver en más o menos detalle la morfología polínica. Después del primer chequeo general para comprobar los pólenes más abundantes y la densidad de granos de polen, se determinan las frecuencias de cada polen como detallan los métodos armonizados de Melisopalinología [Von der Ohe et al., 2004].

3.5. Análisis sensorial

Para abordar el análisis sensorial se formó un panel de catadores, entre el propio personal del Laboratorio de Mielles previamente entrenados en el análisis organoléptico de mieles de la D.O.P. Miel de la Alcarria. En este laboratorio hay un registro de entrada de muestras de miel de unas seiscientas o setecientas anuales, a las que se les practica mayoritariamente este tipo de ensayo. El panel de catadores estaba constituido por hombres y mujeres de entre 25 y 50 años.

Se partió del conocimiento previo de los resultados melisopalinológicos (conocimiento del espectro polínico que las define) y del origen geográfico de las mieles.

MATERIALES.-

- La hoja de cata utilizada para el análisis sensorial descriptivo, fue la utilizada de forma rutinaria en el Laboratorio de Mielles (figura II.13). Para la realización de dicha hoja de cata, se tuvo en cuenta un glosario estandarizado, “Rueda del olor y del aroma para la miel” (figura II.14), que hace referencia a todos los atributos y términos empleados en el análisis sensorial descriptivo de las mieles monoflorales europeas [Piana et al., 2004]. Esta hoja contiene la suficiente variedad de términos para poder describir todas las peculiaridades del producto.

- Las muestras se almacenan habitualmente en botes de cristal cerradas con un tapón de rosca, para retardar la dispersión de los aromas y ayudar, así, a su concentración y posterior liberación.

- Otros materiales necesarios para realizar la sesión de cata: espátulas de metal, vasos de plástico con agua y servilletas.

PROCEDIMIENTO.-Con este tipo de análisis se pretende definir las características organolépticas inherentes a una miel con un origen botánico determinado. El análisis sensorial de la miel sigue los pasos fundamentales de cualquier análisis organoléptico.

Fase visual: Apreciación del aspecto exterior de la miel. Se definen el color y tonalidad del producto, la textura (cristalización o no), defectos, impurezas.

Capítulo II. Caracterización de mieles monoflorales producidas en Castilla-La Mancha



**Junta de Comunidades de
Castilla-La Mancha**
Consejo de Agricultura y Desarrollo Rural

LABORATORIO DE MIEL
Centro Agrario de Marchamalo

ANÁLISIS SENSORIAL - HOJA DE VALORACIÓN Y REGISTRO

Operador	Tipo ensayo	Nº Orden	Fecha Datos	Base Datos
	D.O.			
	No D.O.			
Nº Muestra		Fecha Análisis		
Tipo de miel según análisis				
Valores: 1-Suave. 2-Normal. 3-Fuerte				
VISUAL				
Color		Tono		
Ambar Oscuro		Negro		
Ambar		Marrón		
Ambar Claro		Rojo		
Ambar Extra-claro		Naranja		
Blanco		Yema		
Extrablanco		Amarillo		
Blanco Agua		Ocre		
Brillo Espejo		Blanco		
OLFATIVO				
Persistencia		Intensidad		
Floral		Vegetal		
Sutil		Fresco		
Floral		Seco		
Pesado		Verde		
		Verdura		
Aromático		Afrutado		
Balsámico		Almendra amarga		
Encurtido		Azucarado		
Especiado		Cítrico		
Madera		Fresco		
Resinoso		Fruta Desecada		
		Pesado		
Animal		Químico		
Establo		Antiséptico		
Proteico		Petroquímico		
Transpiración		Punzante		
Cálido		Degradado		
Ahumado/ Holín		Ácido		
Caramelo		Amoniacoal		
Láctico		Azufrado		
Oleoso		Humedo		
Sutil		Pútrido		
Tostado		Rancio		
GUSTATIVO				
Persistencia		Intensidad		
Sabor		Gusto		
Ácido		Afrutado-Fruta Seca		
Amargo		Almendra amarga		
Dulce		Antiséptico		
Salado		Aromático		
Retrogusto		Balsámico		
Astringente		Encurtido		
Empalagoso		Especiado		
Fresco		Floral		
Picante		Cítrico		
Seco		Madera		
Tostado		Oleoso		
Caramelo		Regaliz		
Rancio		Verdura		
TEXTURA		DEFECTOS		
Cristalizado		Acuosa		
Líquido		Calentada		
Pastoso		Cristal Heterogéneo		
Untuoso		Espuma		
Granuloso		Fases		
		Fermentación		
		Impurezas		
OBSERVACIONES				
Agradable	Si No			Cumple D.O.
				Si No
Vº Bº El Director Técnico		El Analista		

FiguraII.13. Hoja de cata utilizada en el análisis sensorial.

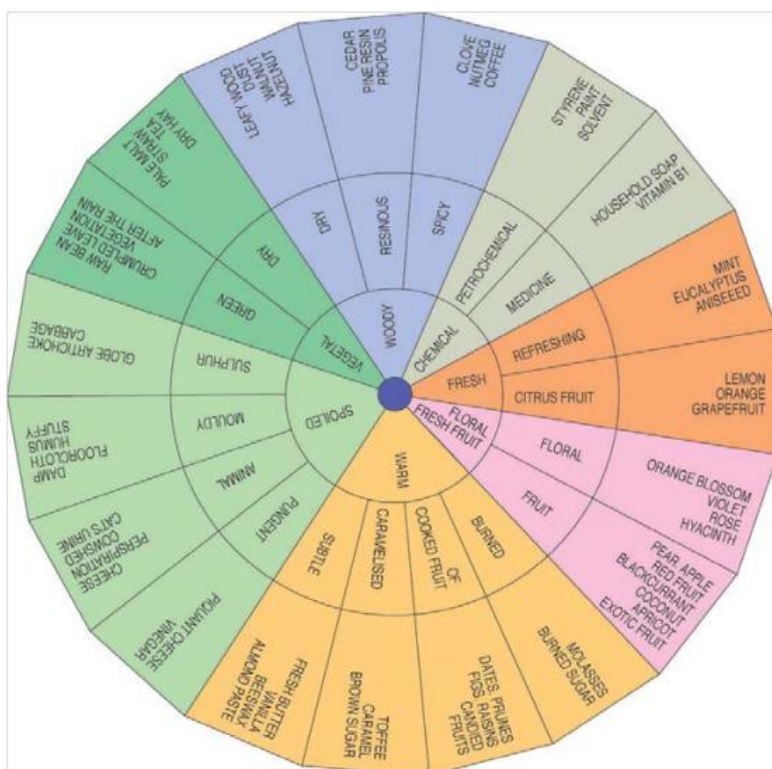


Figura II.14. Rueda del olor y del aroma para la miel [Piana et al., 2004].

El color se define según los términos que se reflejan en la figura II.15, donde se representan los grados de color y su equivalente en mm de Pfund.

En el caso de la fase olfativa se aborda la apreciación aromática de la miel, definiéndose según el vocabulario normalizado de la rueda de olores y aromas de la miel [Piana et al., 2004]. Se cuantifica la intensidad y persistencia del olor. El olor se aprecia por vía nasal directa y por vía retronasal.

Mediante la fase gustativa se detalla la apreciación del sabor de la miel. Se evalúa gusto y retrogusto.

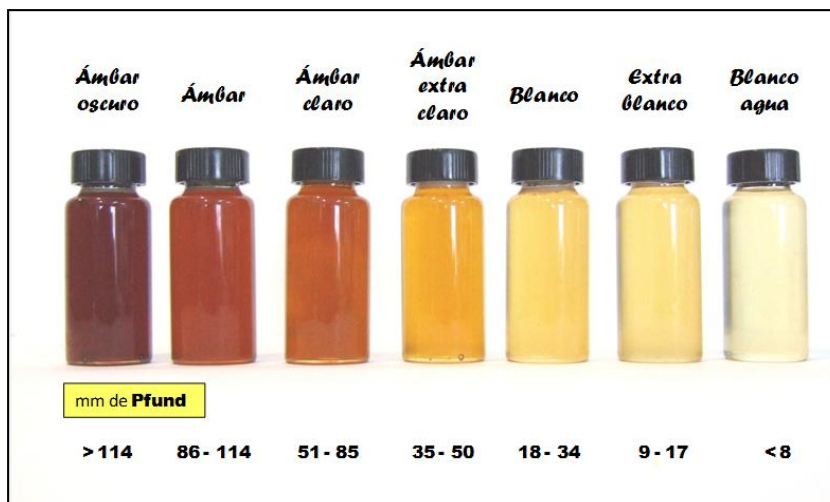


Figura II.15. Escala de colores de la miel.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el sector apícola, aunque es cada vez mayor su profesionalidad y los controles de calidad realizados a los productos, resulta todavía escaso el conocimiento de las propiedades y el valor nutritivo de la miel según su procedencia botánica y el área geográfica de producción. Las mieles de Castilla-La Mancha apenas han sido estudiadas, hasta la fecha, con excepción de las originarias de la comarca de la Alcarria [Ortiz Valbuena, 1992].

Para llevar a cabo la caracterización de las mieles monoflorales producidas en Castilla-La Mancha, en primer lugar se van a detallar y discutir los resultados obtenidos de cada parámetro físico-químico, a continuación los perfiles palinológicos y sensoriales, para finalizar resumiendo de forma esquemática las características propias de cada tipo de miel.

4.1. Parámetros físico-químicos de calidad

Debido a la necesidad de satisfacer criterios de calidad y certificación, previa a la comercialización del producto, se analizan, entre otros, los parámetros que determina la legislación vigente (Directiva Europea 2001/110/CE de 20 de diciembre armonizada con la legislación española en el Real Decreto 1049/2003) [DOUE L 10/47 de 12 de 86

enero de 2002; BOE nº186 de 5 de agosto de 2003]. Algunos de estos parámetros tienen mucho que decir del origen botánico de la miel y, en muchas ocasiones, también del geográfico. Dos de los parámetros analizados, el hidroximetilfurfural y la humedad, son parámetros que marcan calidad más que ser señas de identidad de la miel. Los parámetros de calidad que más información aportan al origen botánico son la conductividad eléctrica, el pH, la acidez y el color. Este último no es un parámetro recogido en la normativa, no es obligatorio para evaluar la calidad de la miel, por lo que no se incluye en este apartado, se desarrolla en el apartado siguiente. Hay numerosos estudios que se apoyan en los datos físico-químicos de calidad para la caracterización de mieles [Terrab et al., 2002; Persano Oddo & Piro, 2004; Devillers et al., 2004] e incluso, se utilizan para discriminar entre orígenes geográficos [Acquarone et al., 2007].

En aquellos casos para los cuales la legislación actual aporta datos de valores máximos y/o mínimos permitidos de los diferentes parámetros físico-químicos, se ha realizado la comparación con los valores obtenidos para las distintas mieles estudiadas.

Asimismo, se ha tenido en cuenta en la discusión de los resultados, el trabajo recopilatorio de Persano Oddo & Piro [2004] de las características de las mieles monoflorales europeas, con más de 6000 muestras analizadas provenientes de diferentes países.

4.1.1. Parámetro de frescura: HMF

El hidroximetilfurfural, abreviadamente HMF, es un aldehído cíclico ($C_6H_6O_3$) que aparece en la miel, pero no es un componente habitual del producto fresco. Se genera por degradación de los azúcares, principalmente a partir de la deshidratación de la fructosa y de la glucosa en medio ácido, sobre todo, cuando se eleva la temperatura. La miel recién extraída, con buenas prácticas de manipulación, contiene una pequeña cantidad de HMF, que se incrementa con el envejecimiento, de forma más pronunciada si es muy ácida. Por esto, el HMF es utilizado en el mercado como un parámetro indicador de la frescura y el sobrecalentamiento de la miel. Durante la obtención y envasado, este alimento es sometido, en ocasiones, a calentamientos temporales controlados en intercambiadores de calor. Sin embargo, este

calentamiento, así como el incremento de su temperatura, debido al mal manejo durante su transporte y almacenamiento, puede producir incrementos en su contenido de HMF.

En este estudio se ha utilizado la medida del HMF para comprobar que las mieles están en condiciones óptimas de cara a su caracterización. La concentración de HMF en miel suele estar entre 0 y 200 mg/kg. La norma europea y en consecuencia la española [DOUE L 10/47 de 12 de enero de 2002; BOE nº186 de 5 de agosto de 2003], marca los siguientes niveles máximos de este compuesto en la miel:

- En general, excepto miel para uso industrial: **no más de 40 mg/kg**
- Miel de origen declarado procedente de regiones de clima tropical y mezclas de estas mieles: no más de 80 mg/kg.

En la tabla II.5 se resumen los resultados medios de HMF de las mieles de Castilla-La Mancha. La desviación estándar del contenido en HMF es grande en la mayoría de mieles, lo que indica una gran dispersión de los datos, debido fundamentalmente, a que este parámetro no tiene que ver con el tipo de miel, sino con el tratamiento o procesado que le ha dado el apicultor a cada una de las muestras. En la figura II.16 se muestran los valores máximos permitidos de HMF, de acuerdo a la legislación actual, así como los valores mínimos, medios y máximos obtenidos para las mieles estudiadas.

Tabla II.5. Contenido en HMF (mg/kg) de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desv. estándar.	Mínimo- Máximo
Romero	11	2.54	2.23	0.00 – 11.38
Espliego	9	3.18	3.27	0.00 – 10.68
Tomillo	16	2.67	1.79	0.00 – 5.39
Viborera	12	6.44	4.35	0.00 – 12.43
Castaño	11	1.63	2.39	0.00 – 7.78
Mielato	5	3.71	4.83	0.00 – 11.68

Se observa que en todos los tipos de mieles, hay al menos una muestra que no tiene nada de HMF y que todas ellas están muy por debajo de 40 mg/kg, el límite máximo permitido por la Directiva Europea. Los valores de HMF de las mieles producidas en la comarca de la Alcarria, romero y espliego, con denominación de origen, y tomillo, están por debajo de los dados en el pliego de condiciones de la D.O.P. Miel de Alcarria, 15.0 mg/kg [BOE nº299 de 9 de diciembre de 2010].

La determinación de HMF no sólo indica o podría indicar las temperaturas de proceso, sino que también, indirectamente, puede alertar sobre una posible adulteración. Durante la producción de jarabe de glucosa o jarabe de alta fructosa, con lo que se suele adulterar la miel, se forma HMF en cantidades superiores a las que naturalmente posee. Por tal motivo una miel fresca con alto contenido de HMF puede dar un indicio de adulteración.

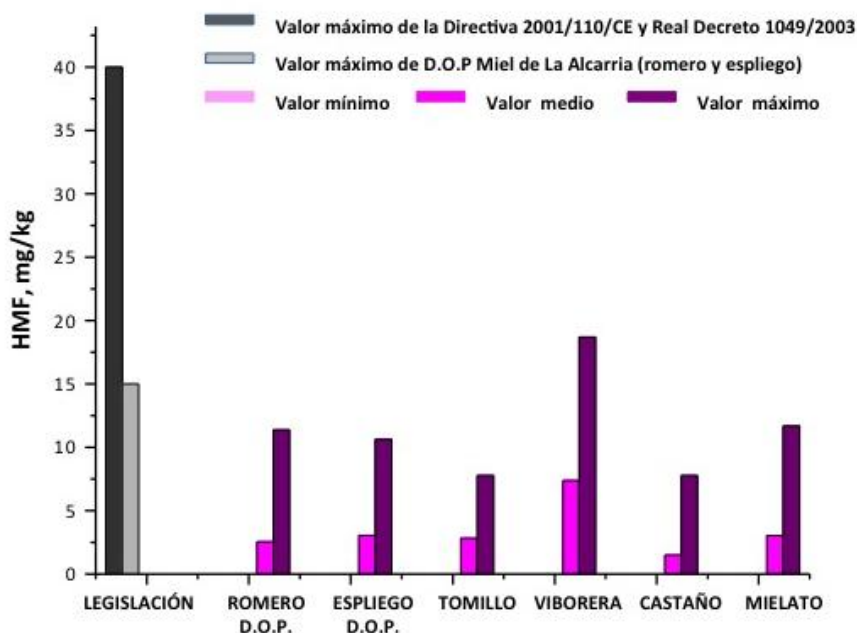


Figura II.16. Valores de HMF

En el caso de las mieles estudiadas de Castilla-La Mancha, los valores de HMF son en todos los casos inferiores a 12.43 mg/kg, lo que pone de manifiesto su frescura y la ausencia de adulteración.

4.1.2. Humedad

El contenido en agua o humedad de la miel es un factor determinante de su calidad que influye en la viscosidad, peso específico y que condiciona la palatabilidad y sabor [Snowdon & Cliver, 1996; Bogdanov et al., 2004]. El contenido de humedad depende de la temporada de cosecha, junto con el grado de madurez alcanzado en la colmena. La humedad de la miel no debe sobrepasar un determinado porcentaje para evitar fermentaciones. De esta forma, cosechar la miel con alta humedad o adicionarla después podría estropearla [Bogdanov & Martin, 2002]. Este parámetro es muy importante en la determinación de la vida útil del producto. También al estar influido por la climatología y por lo tanto, también puede dar una ligera idea del origen geográfico de una miel.

A continuación se dan los valores máximos permitidos para la comercialización de una miel en el mercado europeo [DOUE L 10/47 de 12 de enero de 2002; BOE nº186 de 5 de agosto de 2003]:

- En general: **no más del 20%**
- Miel de brezo *Calluna* y miel para uso industrial en general: no más del 23%
- Miel de brezo *Calluna vulgaris* para uso industrial: no más del 25%.

En la tabla II.6 se resumen los contenidos de agua de los diferentes tipos de mieles. En todas las mieles estudiadas el porcentaje en peso de agua fue menor del 20%, lo que garantiza su estabilidad microbiológica. En general los valores obtenidos indican una madurez y un momento de extracción del producto, adecuados en todas las muestras. En parte esto es normal, ya que la humedad ambiental es baja en esta zona de España, donde las precipitaciones son habitualmente escasas [Ortiz Valbuena 1992].

La figura II.17 muestra los valores máximos permitidos de humedad, de acuerdo a la legislación actual, así como los valores mínimos, medios y máximos obtenidos para las mieles estudiadas.

Tabla II.6. Humedad (%) (p/p) de las distintas mieles monoflorales estudiadas.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desv. estándar.	Mínimo- Máximo
Romero	11	15.97	0.70	14.67 – 17.20
Espliego	9	16.27	1.55	14.53 – 19.40
Tomillo	16	16.25	0.74	15.07 – 18.70
Viborera	12	16.13	0.97	14.67 – 18.20
Castaño	11	14.80	0.87	13.48 – 16.30
Mielato	5	15.10	0.36	14.67 – 15.47

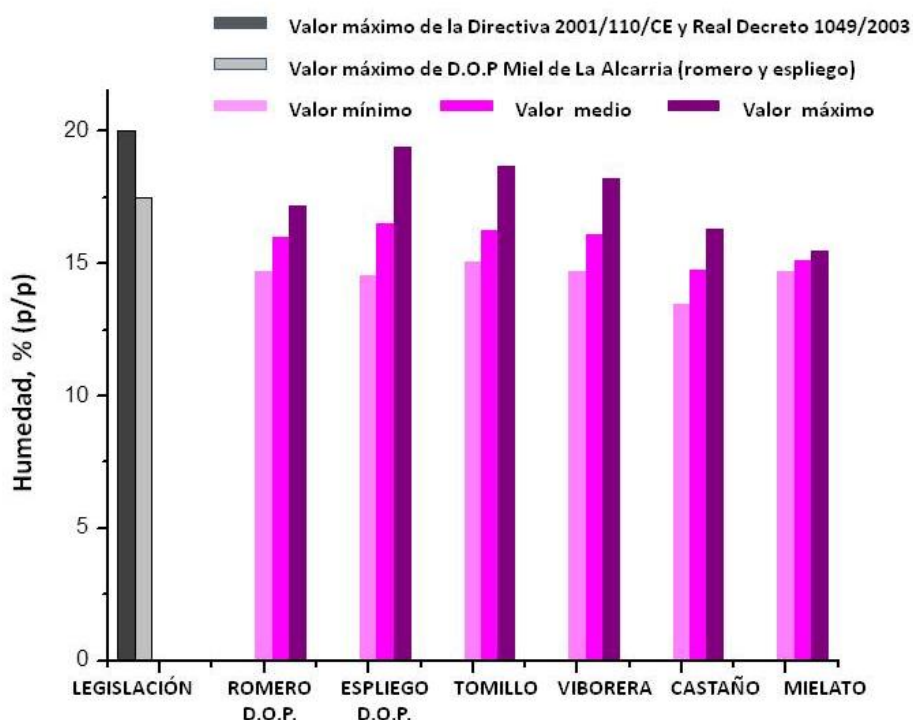


Figura II.17. Valores de humedad

Los valores medios de humedad de las mieles producidas en la comarca de la Alcarria, romero, espliego y tomillo están por debajo de los dados en el pliego de condiciones de la D.O.P. Miel de la Alcarria, 17.5% (p/p) [BOE nº299 de 9 de diciembre de 2010].

Destacar que los valores de humedad obtenidos para los mielatos son bajos, puesto que este tipo de miel proviene de la savia elaborada que tiene un mayor grado de humedad que el néctar.

Los valores mínimos y máximos obtenidos para todas las mieles estudiadas, tabla II.6, están comprendidos en el intervalo 13.48 – 19.40% (p/p) lo que indica una madurez óptima, debido entre otras razones a las modernas colmenas utilizadas por los apicultores de la región, el momento adecuado de cosecha y las condiciones climatológicas de la zona. Es importante recordar que la época de cosecha de todas las mieles estudiadas estuvo comprendida entre los meses de mayo y septiembre (tabla II.3) y por tanto, con pequeñas variaciones climatológicas.

La tabla II.7 compara los valores obtenidos de humedad con los encontrados en la bibliografía para mieles españolas de diferente origen geográfico, así como con la recopilación de mieles europeas.

Los valores de humedad de las mieles estudiadas, a excepción de las mieles de tomillo, son menores que los recopilados para las mieles europeas. Este hecho no es demasiado significativo ya que la procedencia de las mieles recopiladas es muy variada. Sí resulta más interesante la comparación con otras mieles españolas de un amplio espectro geográfico, pero en definitiva mieles de la península.

Para llevar a cabo la comparación se realizó una prueba de hipótesis con los datos bibliográficos para cada tipo de miel. Ya que los datos se ajustan a una distribución normal, se llevó a cabo un test t, $P=0.05$, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre las medias obtenidas y la media de la bibliografía para las mieles de romero, espliego, tomillo y viborera.

Sin embargo, si hay diferencias para las mieles de castaño y de mielato. Como más adelante se comentará, las mieles de castaño tienen en algún caso, procedencias

de comunidades del norte de España con una climatología diferente a la de Castilla-La Mancha. Con respecto a los mielatos no siempre queda claro el taxón de origen por lo que las diferencias pueden ser atribuidas a este hecho.

Si se desglosan los datos de la tabla II.7, se observa que las mieles de romero (Cuenca y Guadalajara) y de castaño (Toledo) presentan valores de humedad inferiores a los encontrados en la bibliografía. En el caso de las mieles de castaño, la mayoría proviene de zonas de mayor índice de precipitación, como las comunidades de Galicia y Principado de Asturias y la provincia de León, lo que se traduce en una mayor humedad en las mieles. Para las mieles de romero, en la bibliografía se encuentran valores de humedad para mieles de muy distinto origen geográfico. Es interesante observar que los valores de humedad obtenidos para las mieles de romero estudiadas son inferiores a los encontrados para mieles de Soria, limítrofe con la provincia de Guadalajara, y de la misma provincia de Cuenca. Las diferencias se pueden atribuir a la época de cosecha, que no se explicita en ningún caso.

En el caso de las mieles de espliego, aquellas de la provincia de Cuenca presentan valores de humedad similares, y de nuevo inferiores a mieles del mismo origen botánico de Soria. Este hecho se repite con la miel de tomillo.

En relación con la miel de viborera (Ciudad Real y Toledo) y mielato (Guadalajara), los valores de humedad son muy similares a los dados para muestras recolectadas en la Comunidad de Madrid, con características climatológicas parecidas. Los mielatos presentan valores de humedad bajos si se comparan con los datos dados para Huesca, la comunidad de Galicia y la provincia de Soria.

4.1.3. Acidez libre y pH

➤ ACIDEZ LIBRE

La acidez de la miel se debe a que en su composición hay ácidos orgánicos libres (acidez libre), fundamentalmente ácido glucónico, en equilibrio con sus lactonas y ésteres y sus iones inorgánicos (fosfatos, cloruros y sulfatos). Esta acidez contribuye al sabor y la estabilidad antimicrobiana [Ortiz Valbuena, 1992].

Tabla II.7. Humedad de las mieles de Castilla-La Mancha y su comparación con a) otras mieles europeas y b) otras mieles españolas

HUMEDAD, % (p/p)						
Tipo de miel	Media experimental	Mieles europeas (Persano&Piro, 2004)		Mieles españolas		
		Media	País de procedencia	Media	Procedencia (Comunidad autónoma o provincia)	Referencia
Romero	15.9	16.4	España Francia Italia	16.2	La Rioja	Sanz&Sanz, 1994a
				16.8	Aragón	Pérez-Arquillué et al., 1994
				14.2	Huesca	Díaz&Fernández, 1998
				19.1	Varias zonas	Mateo&Bosch-Reig, 1998
				16.3	Granada	Orantes, 2004
Espliego	16.3	16.7	Bulgaria España Francia	17.4	Soria	Nozal et al., 2005
				17.9	Cuenca	Gómez&Court, 2010
				17.9 ¹	----	Oroian et al., 2013
				17.2	Aragón	Pérez-Arquillué et al., 1995
				16.6	Varias zonas	Mateo&Bosch-Reig, 1998
Tomillo	16.5	15.9	Francia Grecia Italia	17.5	Soria	Nozal et al., 2005
				16.0	Cuenca	Gómez&Court, 2010
				18.0	Varias zonas	Pérez-Arquillué et al., 1995
				16.1	Granada	Orantes, 2004
				16.3	Varias zonas	Terrab et al., 2004
Viborera	16.1	----	----	17.5	Soria	Nozal et al., 2005
				17.2	Varias zonas	Pérez-Arquillué et al., 1995
				16.1	Madrid	Sanz et al., 2004

Tabla II.7. (continuación)

HUMEDAD, % (p/p)						
Tipo de miel	Media experimental	Mieles europeas (Persano&Piro, 2004)		Mieles españolas		
		Media	País de procedencia	Media	Procedencia (Comunidad autónoma o provincia)	Referencia
				16.6	Madrid	Gómez&Orantes, 2010
Castaño	14.8	17.5	Alemania Bélgica Bulgaria Francia Grecia Italia Portugal Suiza	16.2	----	Pujolá & Sanz, 1994
				15.4	Granada	Orantes, 2004
				16.6	León	Orantes&Torres, 2010
				17.3	Galicia	Escuredo et al., 2012
				18.0	Galicia	Escuredo et al., 2013
				17.5	Asturias	http://www.mielde lapuela.com
Mielato	15.1	16.1	Alemania Bulgaria Francia Grecia Italia Portugal Suiza	15.8	Varias zonas	Mateo&Bosch-Reig, 1998
				16.2	Huesca	Díaz&Fernández, 1998
				16.7	Soria	Nozal et al., 2005
				15.5	Madrid	Pérez et al., 2007
				15.0	Madrid	Gómez&Orantes, 2010
				16.9	Galicia	Escuredo et al., 2013

Los límites máximos de acidez libre legislados [DOUE L 10/47 de 12 de enero de 2002; BOE nº186 de 5 de agosto de 2003] son:

- En general: **no más de 50 miliequivalentes de ácidos por kg** (meq/kg)
- Miel para uso industrial: no más de 80 meq/kg.

Como se observa en la tabla II.8, los valores más bajos de acidez, se dan en las mieles de romero, y a continuación en las mieles de tomillo y espliego, con valores similares entre ellas, todas procedentes de la comarca de la Alcarria. Con concentraciones superiores aparecen los mielatos, a continuación las mieles de viborera que tienen un intervalo de valores muy amplio, y por último, aparecen las de castaño con los niveles más altos de acidez libre.

Tabla II.8. Acidez libre (meq/kg) de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desv. stán.	Mínimo- Máximo
Romero	11	12.42	5.13	9.00 – 26.80
Espliego	9	18.81	3.74	14.40 – 25.80
Tomillo	16	20.19	3.31	14.50 – 27.50
Viborera	12	13.30	10.13	3.25 – 34.5
Castaño	11	41.86	13.77	22.00 – 61.50
Mielato	5	30.23	0.572	29.50 – 31.00

La figura II.18 muestra para su comparación, los valores máximos permitidos de acidez libre de acuerdo a la legislación actual, así como los valores mínimos, medios y máximos obtenidos para las mieles estudiadas.

En el pliego de condiciones de la D.O.P. Miel de la Alcarria se da como valor límite de acidez libre: 35.0 meq/kg. Como podemos observar en la tabla II.8. y en la figura II.18, las mieles monoflorales producidas en la comarca de la Alcarria (romero, espliego y tomillo) cumplen esta limitación.

Pese a que las medias de los valores de acidez no superan el límite máximo marcado por la normativa, se detectó que en un 30.8% de las muestras de castaño y en un 26.7% de las de viborera la acidez libre estaba por encima de este límite, aunque no se detectaron signos de fermentación en ninguna de las muestras. Esto se

explicaría si tenemos en cuenta que hay mieles que de forma natural y recién extraídas presentan una acidez libre mayor que el límite legal estipulado, sin que por ello planteen problemas de fermentación, conservación ni alteración. Se ha achacado la elevada acidez en algunos tipos de miel, a cuando ésta procede de zonas donde hay mezcla de ericáceas (brezo, *Calluna* y madroño) con mielatos de castaños, de encinas y/o robles [Gómez-Pajuelo, 1996]. Este podría ser el caso de las mieles de castaño que son producidas en bosques de castaño en zonas de montaña del norte de Toledo, donde también son frecuentes las especies de ericáceas y robles. Muchos investigadores consideran apropiado un cambio en la legislación en relación con los valores máximos de acidez libre [Gómez-Pajuelo, 1996].

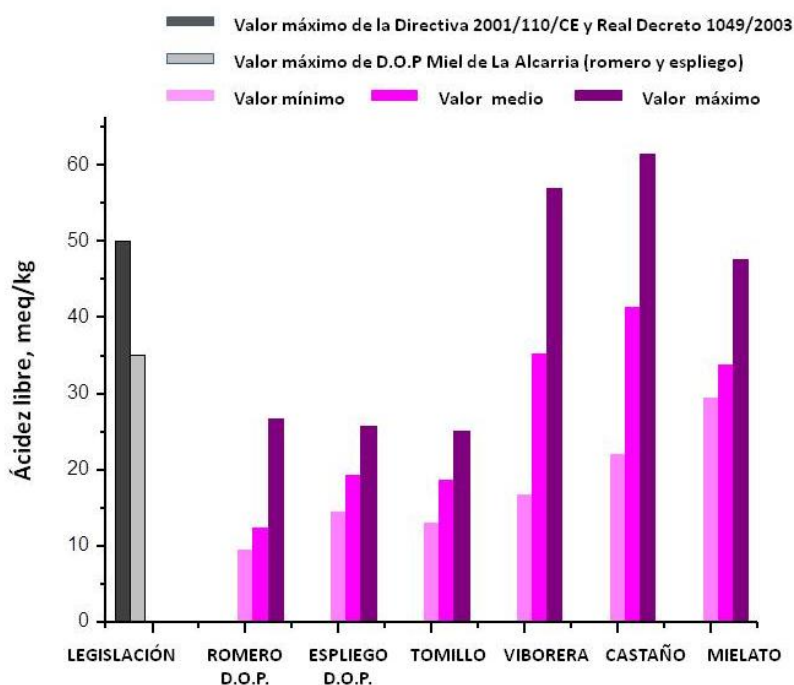


Figura II.18. Valores acidez libre

Las mieles de viborera son muy variables, ya que esta planta (*Echium* spp) es muy frecuente en una gran variedad de paisajes, por lo que su composición también variará mucho dependiendo de sus acompañantes botánicos, también así su acidez. En

conclusión, no se retiraron estas muestras que sobrepasan el límite de acidez libre porque se supone que estos altos niveles son consecuencia del origen botánico.

La tabla II.9 muestra los valores de acidez libre para las mieles estudiadas, los valores dados por Persano & Piro (2004) y aquellos obtenidos de la bibliografía para mieles españolas

De nuevo se han realizado las pruebas de hipótesis, test t y test de Wilcoxon, ya que en algunos casos los datos de la bibliografía no se ajustaban a una distribución normal. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas para un valor de $P=0.05$ en ninguna de las mieles. A la vista de los datos bibliográficos para las mieles de tomillo no se ha realizado el contraste de hipótesis.

Comparando los resultados con la gran recopilación de datos sobre mieles monoflorales europeas, se observa que tanto las mieles de romero como las de espliego, tienen valores medios de acidez libre próximos a los recogidos para las mieles europeas. Las medias dadas para mielatos (de mieladas de una amplia variedad de árboles, no solo del tipo *Quercus*) y castaño son inferiores a las obtenidas en este estudio. Por el contrario, las mieles de tomillo tienen menor contenido en ácidos libres que la media europea.

En la “Contribución a la denominación de origen de la miel de la Alcarria” [Ortiz Valbuena, 1992], donde se evaluaron los parámetros de calidad de todas las mieles en conjunto (mono y multiflorales) producidas en la Alcarria, el valor medio de este parámetro fue de 16.5 meq/kg. Comparando este resultado con los encontrados para las mieles originarias de esta comarca (tabla II.7), vemos que las mieles de romero están por debajo de ese valor medio, mientras que las de espliego y tomillo presentan valores superiores.

Los datos de acidez libre de mieles españolas encontrados en la bibliografía, presentan valores superiores a los datos de este estudio para las mieles de la Alcarria, romero, espliego y tomillo. En relación al resto de mieles, viborera, castaño y mielatos, la acidez libre es muy similar.

Tabla II.9. Acidez libre de las mieles de Castilla-La Mancha y su comparación con a) otras mieles europeas y b) otras mieles españolas

Acidez libre, meq/kg						
Tipo de miel	Mieles europeas (Persano&Piro, 2004)		Mieles españolas			
	Media experimental	Media	País de procedencia	Media	Procedencia (Comunidad autónoma o provincia)	Referencia
Romero	12.42	11.5	España Francia Italia	15.5 16.2 17.7 13.9 15.9	La Rioja Aragón Huesca Granada Soria	Sanz&Sanz, 1994b Pérez-Arquillué et al., 1994 Díaz&Fernández, 1998 Orantes, 2004 Nozal et al., 2005
Espliego	19.81	17.3	Bulgaria España Francia	26.2 22.9	Varias zonas Soria	Pérez-Arquillué et al., 1995 Nozal et al., 2005
Tomillo	20.19	37.2	Francia Italia	26.9 25.9 27.2 23.6	Varias zonas Granada Varias zonas Soria	Pérez-Arquillué et al., 1995 Orantes, 2004 Terrab et al., 2004 Nozal et al., 2005
Viborera	13.30	----	----	26.2 38.1 36.2	Varias zonas Madrid Madrid	Pérez-Arquillué et al., 1995 Sanz et al., 2004 Gómez&Orantes, 2010

Tabla II.9. (continuación)

Acidez libre, meq/kg						
Tipo de miel	Media experimental	Mieles europeas (Persano&Piro, 2004)		Mieles españolas		
		Media	País de procedencia	Media	Procedencia (Comunidad autónoma o provincia)	Referencia
Castaño	41.86	13.0	Alemania Bélgica Bulgaria Francia Grecia Italia Portugal	48.2	---	Pujolá&Sanz, 1994
				28.8	Granada	Orantes, 2004
				44.7	León	Orantes&Torres, 2010
				32.8	Asturias	http://www.mieldeapuela.com
Mielato	30.23	26.0	Bélgica Francia Suiza	99.9	Huesca	Díaz&Fernández, 1998
				29.3	Soria	Nozal et al., 2005
				39.1	Madrid	Soria et al., 2005
				35.9	Varias zonas	Pérez et al., 2007
				43.2	Varias zonas	Vela et al., 2007

➤ **pH**

La miel se caracteriza por presentar un pH ácido, entre 3.4 y 6.1, como ya se comentó en el capítulo I. Los pH de las mieles estudiadas están comprendidos entre 3.64 y 5.77 (tabla II.10).

Los pH más altos se corresponden con las mieles más oscuras, castaño y mielato, que habitualmente poseen un mayor contenido mineral [Persano Oddo et al. 1986]. Les siguen las mieles de tomillo, viborera, romero y espliego.

Tabla II.10. pH de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desv. estándar.	Mínimo- Máximo
Romero	11	4.04	0.11	3.91 – 4.27
Espliego	9	4.00	0.30	3.68 – 4.52
Tomillo	16	4.47	0.19	3.92 – 4.67
Viborera	12	4.20	0.33	3.72 – 4.90
Castaño	11	5.03	0.34	4.62 – 5.77
Mielato	5	4.83	0.28	4.59 - 5.27

La tabla II.11 presenta los valores de mieles europeas y los datos de pH encontrados en la bibliografía para mieles españolas. Comparando con la recopilación de mieles europeas, observamos que los valores de pH de las mieles de romero y espliego son muy similares a las producidas en Castilla-La Mancha, 4.0 y 3.8 respectivamente. En el caso de las mieles de tomillo, el pH de nuestras mieles es superior a la media europea (3.8), y al revés ocurre con las mieles de castaño (5.3) y mielato (5.1) que son ligeramente más ácidos que la media europea [Persano Oddo & Piro, 2004].

De acuerdo con el test t, $P=0.05$, no hay diferencias estadísticamente significativas entre la media de pH obtenida y los valores de la bibliografía para las mieles de romero, tomillo, castaño y mielato. No se ha realizado la prueba de contraste con los datos de las mieles de espliego y viborera al tener un número insuficiente de datos para realizarla.

Tabla II.11. pH de las mieles de Castilla-La Mancha y su comparación con a) otras mieles europeas y b) otras mieles españolas

pH						
Tipo de miel	Media experimental	Mieles europeas (Persano&Piro, 2004)			Mieles españolas	
		Media	País de procedencia	Media	Procedencia (Comunidad autónoma o provincia)	Referencia
Romero	4.04	4.0	España Francia Italia		3.82	Sanz&Sanz, 1994b
					3.71	Pérez-Arquillué et al., 1994
					4.04	Díaz&Fernández, 1998
					3.89	Mateo&Bosch-Reig, 1998
					3.88	Orantes, 2004
Espiego	4.00	3.8	Bulgaria España Francia		3.86 ¹	Oroian et al., 2013
					3.54	Pérez-Arquillué et al., 1995
Tomillo	4.47	3.8	Francia Grecia Italia		3.97	Mateo&Bosch-Reig, 1998
					4.24	Pérez-Arquillué et al., 1995
					4.38	Orantes, 2004
					4.20	Terrab et al., 2004

¹ Adquiridas en supermercado

Tabla II.11. (continuación)

pH						
Tipo de miel	Media experimental	Mieles europeas (Persano&Piro, 2004)			Mieles españolas	
		Media	País de procedencia	Media	Procedencia (Comunidad autónoma o provincia)	Referencia
Viborera	4.20	----	----	4.10 3.67	Madrid Madrid	Sanz et al., 2004 Gómez&Orantes, 2010
Castaño	5.03	5.3	Bélgica Francia Italia Portugal Suiza	4.70 4.38 4.08	Granada León Asturias	Orantes, 2004 Orantes&Torres, 2010 http://www.mieldeleapuela.com
Mielato	4.83	4.1	Bélgica Francia Países Bajos Suiza	3.98 4.87 4.61 4.96 4.64 4.47 4.13 ¹	Huesca Madrid Varias zonas Varias zonas Varias zonas Varias zonas ----	Díaz&Fernández, 1998 Mateo&Bosch-Reig, 1998 Soria et al., 2005 Pérez et al., 2007 Vela et al., 2007 González et al., 2008 Oroian et al., 2013

¹ Adquiridas en supermercado

El pH medio encontrado en la caracterización de la miel de la Alcarria (que no tenía en cuenta la mono o multifloralidad de las muestras) fue de 4.01 [Ortiz Valbuena et al., 1996]. Nuestras mieles de romero y espliego, originarias de esta comarca, tienen un pH medio muy similar a este. En cambio parece que el néctar de tomillo aporta una mayor basicidad, con unos valores de pH mayores que la media.

4.1.4 Conductividad eléctrica

La medida de la conductividad eléctrica en mieles fue introducida en los años 60, y desde entonces es uno de los parámetros de calidad más útiles para la clasificación de mieles monoflorales. Este parámetro, muy relacionado con el contenido en minerales de la miel [Terrab et al, 2004], nos da idea del origen botánico e incluso, puede dar indicios del origen geográfico de las mieles. Los límites legislados [DOUE L 10/47 de 12 de enero de 2002; BOE nº186 de 5 de agosto de 2003], son los siguientes:

- Miel no incluida en la enumeración de los dos párrafos más abajo indicados, y mezclas de estas mieles: **no más de 0.8 mS/cm**
- Miel de **mielada y miel de castaño**, y mezclas de éstas, excepto con las mieles que se enumeran a continuación: **no menos de 0.8 mS/cm**.
- Excepciones: madroño (*Arbutus unedo*), argaña (*Erica*), eucalipto, tilo (*Tilia*), brezo (*Calluna vulgaris*), manuka o jelly bush (*Leptospermum*), árbol del té (*Melaleuca*).

La tabla II.12 muestra los valores medios obtenidos de conductividad eléctrica de las mieles estudiadas.

La figura II.19 muestra los valores máximos permitidos de conductividad eléctrica, de acuerdo a la legislación actual, así como los valores mínimos, medios y máximos obtenidos para las mieles estudiadas

Tabla II.12. Conductividad eléctrica (mS/cm) de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desv. estándar	Mínimo- Máximo
Romero	11	0.139	0.034	0.110 – 0.231
Espliego	9	0.242	0.074	0.130 – 0.333
Tomillo	16	0.332	0.110	0.190 – 0.620
Viborera	12	0.519	0.296	0.240 – 1.210
Castaño	11	1.183	0.160	0.820 – 1.381
Mielato	5	0.782	0.272	0.550 – 1.210

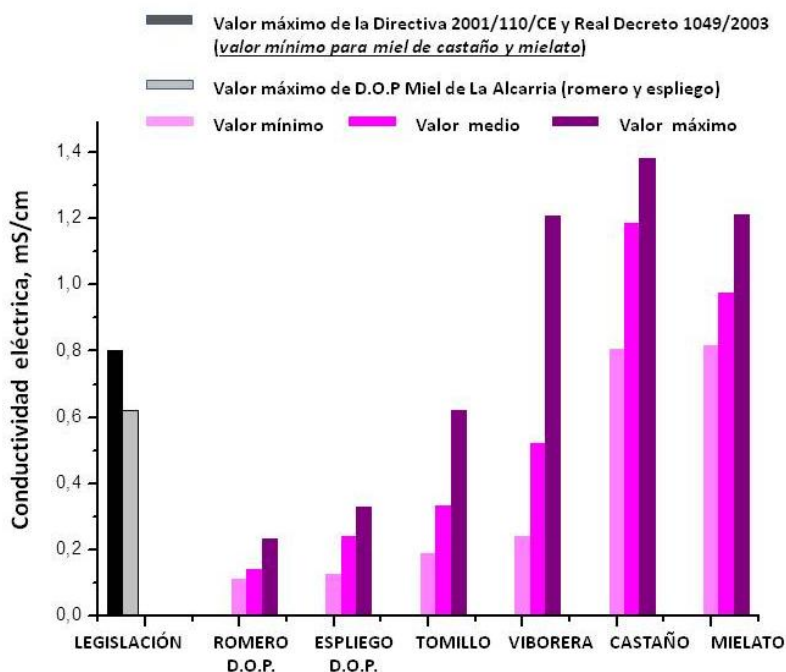


Figura II.19. Valores de conductividad eléctrica

De la recopilación de las principales características de la miel de la Alcarria [Ortiz Valbuena et al., 1996] se extrae una conductividad eléctrica media de 0.243 mS/cm, media superada por la miel de tomillo y en el orden de las de espliego e inferior a la de romero (tabla II.12), variaciones lógicas ya que este parámetro es bastante

característico de la fuente floral. En el último pliego de condiciones de la D.O.P. Miel de la Alcarria [BOE nº299 de 9 de diciembre de 2010], este valor fue aumentado hasta una conductividad eléctrica límite de 0.62 mS/cm. Las mieles monoflorales producidas en la Alcarria (romero, espliego y tomillo) que se han tratado en esta memoria, cumplirían entonces esta especificación técnica.

Las mieles oscuras se distinguen de las mieles de color más claro por tener un valor superior de conductividad [Pérez-Arquillué et al., 1994]. En nuestro estudio se corrobora esta tendencia: las mieles de castaño, oscuras casi negras, tienen una conductividad eléctrica muy alta, y en cambio las de romero de un color muy claro, prácticamente blancas, presentan los valores de conductividad más bajos. El resto de mieles, con un ámbar de tonalidad intermedia, tienen una conductividad media y habitualmente característica del tipo de miel.

En la tabla II.13 se muestran los valores de conductividad eléctrica para las mieles europeas y mieles españolas.

Con respecto a las mieles europeas, la mayoría de las muestras estudiadas tienen valores medios algo menores, excepto las mieles de espliego y, sobre todo, los mielatos, cuya media es muy superior a la europea (0.19 mS/cm).

De nuevo se han realizado las pruebas de hipótesis, test t y test de Wilcoxon, ya que en algún caso los datos de la bibliografía no se ajustaban a una distribución normal. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas para un valor de $P=0.05$ en las mieles de tomillo, castaño y mielatos. Tan sólo las mieles de romero presentan una diferencia estadísticamente significativa. A la vista de los datos bibliográficos para las mieles de espliego y viborera, no se ha realizado el contraste de hipótesis.

4.2. Discriminación de las mieles por su origen botánico, parte A

Los parámetros físico-químicos estudiados hasta ahora, HMF, humedad, acidez libre, pH y conductividad eléctrica, se han utilizado para intentar discriminar las mieles por su origen botánico. Para ello, se han aplicado dos tipos de análisis multivariantes: a) análisis de componentes principales y b) análisis discriminante.

Tabla II.13. Conductividad eléctrica de las mieles de Castilla-La Mancha y su comparación con a) otras mieles europeas y b) otras mieles españolas

Conductividad eléctrica, mS/cm						
Tipo de miel	Mieles europeas (Persano&Piro, 2004)		Mieles españolas			
	Media experimental	Media	País de procedencia	Media	Procedencia	Referencia
					(Comunidad autónoma o provincia)	
Romero	0.139	0.15	España Francia Italia	0.193	La Rioja	Sanz&Sanz, 1994a
				0.155	Aragón	Pérez-Arquillué et al., 1994
				0.276	Huesca	Díaz&Fernández, 1998
				0.165	Granada	Orantes, 2004
				0.203 ¹	----	Oroian et al., 2013
Espliego	0.242	0.21	Bulgaria España Francia	0.184	Varias zonas	Pérez-Arquillué et al., 1995
Tomillo	0.332	0.40	Francia	0.447	Varias zonas	Pérez-Arquillué et al., 1995
			Grecia	0.463	Granada	Orantes, 2004
			Italia	0.395	Varias zonas	Terrab et al., 2004

¹ Adquiridas en supermercado

Tabla II.13. (continuación)

Tipo de miel	Media experimental	Conductividad eléctrica, mS/cm				
		Mieles europeas (Persano&Piro, 2004)		Mieles españolas		
		Media	País de procedencia	Media	Procedencia (Comunidad autónoma o provincia)	Referencia
Viborera	0.519	----	----	0.589 0.546	Madrid Madrid	Sanz et al., 2004 Gómez&Orantes, 2010
Castaño	1.183	1.38	Alemania Bélgica Francia Grecia Italia Portugal Suiza	1.034 1.273 0.804	Granada León Asturias	Orantes, 2004 Orantes&Torres, 2010 http://www.mieldeleapuela.com
Mielato	0.782	0.19	Alemania Bélgica Francia Finlandia Países Bajos Suiza	0.440 1.079 1.044 1.006 0.09 1.497 1.378 ¹	Huesca Madrid Varias zonas Varias zonas Varias zonas Madrid ----	Díaz&Fernández, 1998 Soria et al., 2005 Pérez et al., 2007 Vela et al., 2007 González et al., 2008 Gómez&Orantes, 2010 Oroian et al., 2013

¹ Adquiridas en supermercado

Un problema inherente en el análisis multivariante es el tamaño de los datos que dificulta el reconocimiento de pautas. El objetivo principal del análisis de componentes principales es reducir la dimensión de un conjunto grande de datos. Es una manera de identificar pautas y relaciones en los datos y expresar los mismos de tal manera que se resalten sus similitudes y sus diferencias. El método ayuda a ver si los objetos forman grupos cuando no se espera ningún conocimiento *a priori* de los grupos.

Los datos usados en este estudio de componentes principales han sido las medias obtenidas de los cinco parámetros físico-químicos estudiados para cada tipo de miel.

En el análisis discriminante se construyen modelos capaces de pronosticar la pertenencia de un objeto a una categoría, sobre la base de las características del objeto. En definitiva se trata de clasificar.

Los datos empleados en este estudio de análisis discriminante están constituidos por los valores de los cinco parámetros físico-químicos de las 64 muestras de miel estudiadas: 11 mieles de romero ,9 mieles de espliego, 16 mieles de tomillo, 12 de viborera, 11 muestras de castaño y 5 mielatos. Todos los cálculos se han realizado con los paquetes estadísticos Statgraphics Plus 5.1 e IBM SPSS Statistics 19.

4.2.1 Análisis de componente principales, PCA

La idea del PCA es encontrar autovectores o componentes principales, Z_n , que sean combinaciones lineales de las variables originales, X_n :

$$Z_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + + a_{1n}X_n$$

$$Z_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + + a_{2n}X_n$$

.....

$$Z_n = a_{n1}X_1 + a_{n2}X_2 + a_{n3}X_3 + + a_{nn}X_n$$

Los componentes principales se eligen de manera que el primer componente principal, Z_1 , explique la mayor parte de la variabilidad del conjunto de datos, el segundo componente principal, Z_2 , explique la siguiente mayor parte de la variabilidad y, así sucesivamente. De esta manera, cuando exista correlación significativa, el número de componentes principales es mucho menor que el de las variables originales.

Por lo tanto, lo primero es elegir el número de componentes principales, y para ello se dispone de dos herramientas: los gráficos de sedimentación y la tabla de autovalores, que muestra el porcentaje de varianza acumulada explicada. La tabla II.14 y la figura II.20 muestran los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales para los valores medios de los cinco parámetros físico-químicos estudiados para cada tipo de miel.

Tabla II.14. Autovalores y porcentaje de varianza para los cinco componentes principales

Componente número	Autovalor	Porcentaje de varianza	Porcentaje de varianza acumulada
1	3.80026	76.005	76.005
2	0.90773	18.155	94,160
3	0.19397	3.879	98.039
4	0.07625	1.525	99.564
5	0.02179	0.436	100.00

Como se observa en la tabla II.14, los dos primeros componentes principales explican el 94.2% de la varianza, y por otra parte, los valores más elevados del autovalor son los que corresponden a esos dos componentes, a partir del tercer componente el autovalor disminuye drásticamente. Paralelamente, en el gráfico de sedimentación se observa claramente que el número de componentes a utilizar son dos.

Fijados los dos primeros componentes, la tabla II.15 muestra los coeficientes a_{11} , a_{12} , etc., para cada componente en relación con los cinco parámetros fisicoquímicos, es la tabla de cargas o pesos de los componentes. El estudio de los pesos o cargas de los componentes permite conocer que variables contribuyen en mayor medida a la varianza de cada componente.

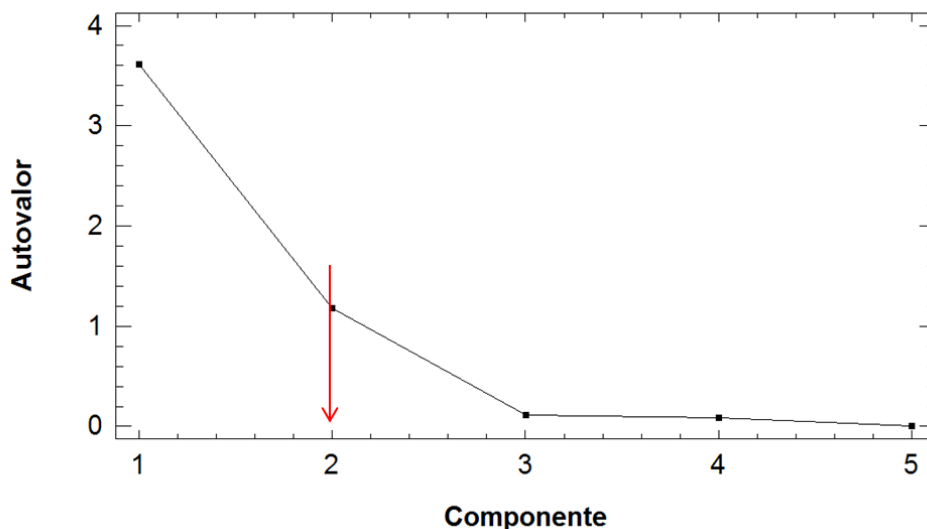


Figura II.20. Gráfico de sedimentación

El primer componente, C1, está directamente correlacionado con la acidez libre y el pH, su valor aumenta cuando aumentan los valores de ambas variables, es decir, C1 explica una parte importante de la varianza asociada a ambos parámetros. El segundo componente, C2, tiene una correlación directa muy fuerte con la variable HMF, en este caso explica casi toda la varianza asociada a la variable, y en mucha menor medida con la humedad. La variable conductividad eléctrica, CE, está directamente correlacionada con ambos componentes principales, casi a partes iguales.

Tabla II.15. Tabla de pesos de los componentes

	COMPONENTE 1	COMPONENTE 2
Acidez libre	0.50038	- 0.09326
Conductividad eléctrica	0.48316	0.31235
HMF	- 0.23716	0.92933
Humedad	- 0.47144	- 0.13872
pH	0.48751	0.10411

La figura II.21 resume de forma gráfica lo observado en la tabla de pesos de los componentes.

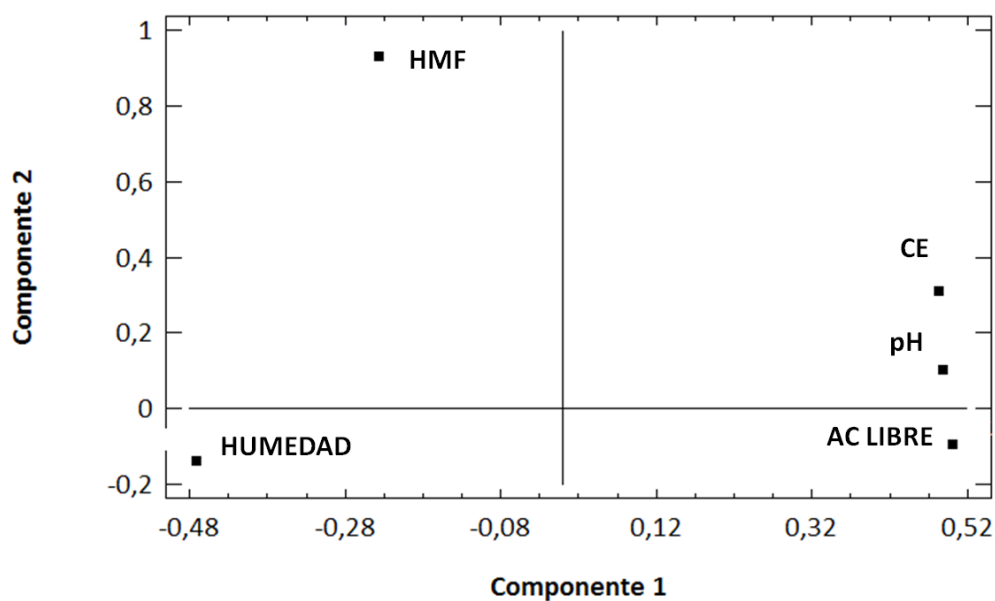


Figura II.21. Gráfico de cargas o pesos de los componentes

Se puede concluir que el componente 1 relaciona propiedades de la miel relacionadas con su composición, pH y acidez libre, así como conductividad, mientras

que el componente 2 da idea de parámetros que podemos denominar “sensoriales” como HMF (frescura) y humedad.

La figura II.22, gráfico doble o *biplot*, representa la superposición del gráfico de cargas con el diagrama de dispersión de las muestras en relación a los dos componentes.

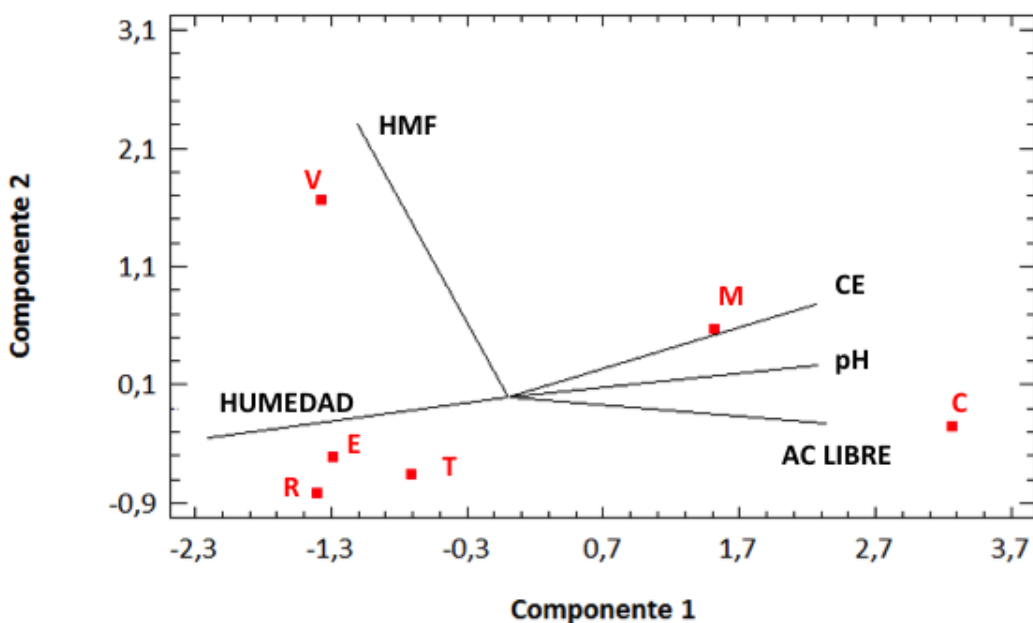


Figura II.22. Diagrama doble o biplot (C:castaño, E:espliego, M:mielatos,R:romero,T:tomillo, V:viborera)

Cada punto representa un conjunto de mieles según su origen botánico. Los puntos correspondientes a mieles de castaño y mielatos tienen valores elevados del componente principal 1 y, por lo tanto, se esperan para dichas muestras valores de acidez libre y pH elevados. De la misma forma las mieles de la región de la Alcarria, romero, espliego y tomillo tendrán los valores más bajos de estas variables. Con respecto a las mieles de viborera, éstas tienen un valor elevado del segundo componente principal y por tanto poseerán los mayores valores de HMF.

Uno de los objetivos planteados era intentar diferenciar las mieles según su origen botánico, y parcialmente se ha conseguido mediante el análisis de

componentes principales. Los cinco parámetros estudiados permiten asignar las mieles a sus dos grupos de origen: taxones arbóreos (castaño y mielatos) y taxones herbáceos (romero, espliego, tomillo y viborera).

4.2.2 Análisis discriminante lineal, LDA

El análisis discriminante ayuda a identificar las características que diferencian a dos o más grupos y a crear una función capaz de distinguir con la mayor precisión posible a los miembros de uno u otro grupo. La pertenencia a los grupos, conocida de antemano, se utiliza como variable dependiente (variable categórica), las variables en las que suponemos que se diferencian los grupos se utilizan como variables independientes (variables de clasificación o discriminantes).

El objetivo último del análisis discriminante es encontrar una combinación lineal de las variables independientes, función discriminante, que mejor permite discriminar a los grupos. Una vez conocida la función discriminante se podrá utilizar para clasificar nuevos casos.

En el análisis discriminante, el proceso de selección de las variables independientes que mas discriminan los grupos establecidos por la variable categórica o dependiente se lleva a cabo paso a paso, método *stepwise*. Este procedimiento implica que 1) sólo se introducen aquellas variables que mas separan a los grupos, es decir que tengan un Lambda de Wilks próximo a cero, de forma que la variabilidad total será debida a las diferencias entre grupos 2) sólo se introducen estas variables si cumplen un criterio de entrada, el estadístico F de entrada, de manera que si la F de entrada asociada a una variable es mayor que un determinado valor crítico (generalmente 3.84) dicha variable se selecciona, y 3) se eliminan aquellas variables que previamente seleccionadas, cumplen un criterio de salida, el estadístico F de salida, si la F asociada a una variable es menor que un determinado valor crítico (generalmente 2.71), dicha variable se elimina.

En este caso, al disponer de sólo cinco variables independientes, HMF, humedad, acidez libre, pH y conductividad, habituales en el análisis de mieles, se ha llevado a cabo un análisis discriminante completo, así se han introducido los 64 valores correspondientes a las cinco variables para cada tipo de miel, y se han obtenido las 5

funciones discriminantes, cuyos autovalores, correlación canónica, estadístico Lambda de Wilks y porcentaje de varianza se presentan en la tabla II.16.

Tabla II.16. Resumen del análisis discriminante

Función discriminante	Autovalor	Porcentaje de varianza	Correlación canónica	Lambdade Wilks	p-valor
1	4.81262	76.60	0.90992	0.05667	0.000
2	0.93664	14.91	0.69544	0.32938	0.000
3	0.46039	7.33	0.56147	0.63789	0.002
4	0.07329	1.17	0.26131	0.93157	0.396
5	0.00016	0.00	0.01260	0.99984	0.924

Para valorar la significación estadística del conjunto de las cinco funciones discriminantes obtenidas disponemos de varios estadísticos y del porcentaje de la varianza total explicada. El p-valor asociado a la Lambda de Wilks informa sobre la hipótesis de igualdad de los grupos, si el valor es inferior a 0.05, se rechaza dicha hipótesis y se concluye que la información aportada por las respectivas funciones discriminantes es estadísticamente significativa al 95% de nivel de confianza. De acuerdo con la tabla II.16 hay tres funciones discriminantes a tener en cuenta.

Los valores de correlación canónica y los autovalores son dos medidas que aportan mucha información. Mientras que la correlación canónica mide las desviaciones de las puntuaciones discriminantes entre los grupos respecto a las desviaciones totales sin distinguir grupos, los autovalores miden las desviaciones de dichas puntuaciones entre los grupos. Por tanto, si sus valores son elevados, en concreto para la correlación canónica, debe ser próximo a la unidad, la dispersión viene explicada por las diferencias entre los grupos, o dicho de otra forma, las funciones correspondientes discriminan mucho los grupos.

En conclusión, la tabla II.16 indica que las dos primeras funciones discriminantes son adecuadas para llevar a cabo la clasificación de los seis tipos de miel, con un 91.51% de varianza explicada.

La tabla II.17 muestra la clasificación llevada a cabo para los seis tipos de mieles de acuerdo a las dos primeras funciones discriminantes, asimismo la figura II.23 muestra el gráfico de dichas funciones.

Tabla II.17. Clasificación de los seis tipos de miel, en porcentaje

TIPO	GRUPO DE PERTENENCIA PRONOSTICADO					
	CASTAÑO	ESPLIEGO	MIELATO	ROMERO	TOMILLO	VIBORERA
CASTAÑO	81.8	0	18.2	0	0	0
ESPLIEGO	0	66.7	0	11.1	11.1	11.1
MIELATO	20.0	0	80.0	0	0	0
ROMERO	0	9.1	0	81.8	9.1	0
TOMILLO	0	6.3	6.3	0	87.4	0
VIBORERA	8.3	33.4	8.3	0	0	50.0
CLASIFICACIÓN CORRECTA:						75.0

El hecho de obtener un porcentaje de tipos de miel correctamente clasificados del 75%, ratifica la significación estadística de las funciones discriminantes. Las mieles de castaño, mielato, romero y tomillo presentan una correcta clasificación con porcentajes superiores al 80%, siendo las mieles de espliego y de viborera las peor clasificadas. Se puede concluir que los cinco parámetros habitualmente analizados en las mieles permiten una buena clasificación en función del origen botánico.

4.3. Color

El color ha sido determinado por dos técnicas: por un lado la determinación espectrofotométrica CIELAB, medida objetiva, completa y precisa, pero compleja de interpretar al obtener varios parámetros para definir el color; y por otro, la colorimetría PFUND, habitualmente utilizada para dar el color de la miel, que por su simplicidad puede ser usada por apicultores y por personal no especializado y que usualmente, es una medida dependiente del operador; pero en este estudio la subjetividad ha sido eliminada al hacer las medidas espectrofotométricamente y relacionándolas posteriormente con su equivalente en mm de Pfund.

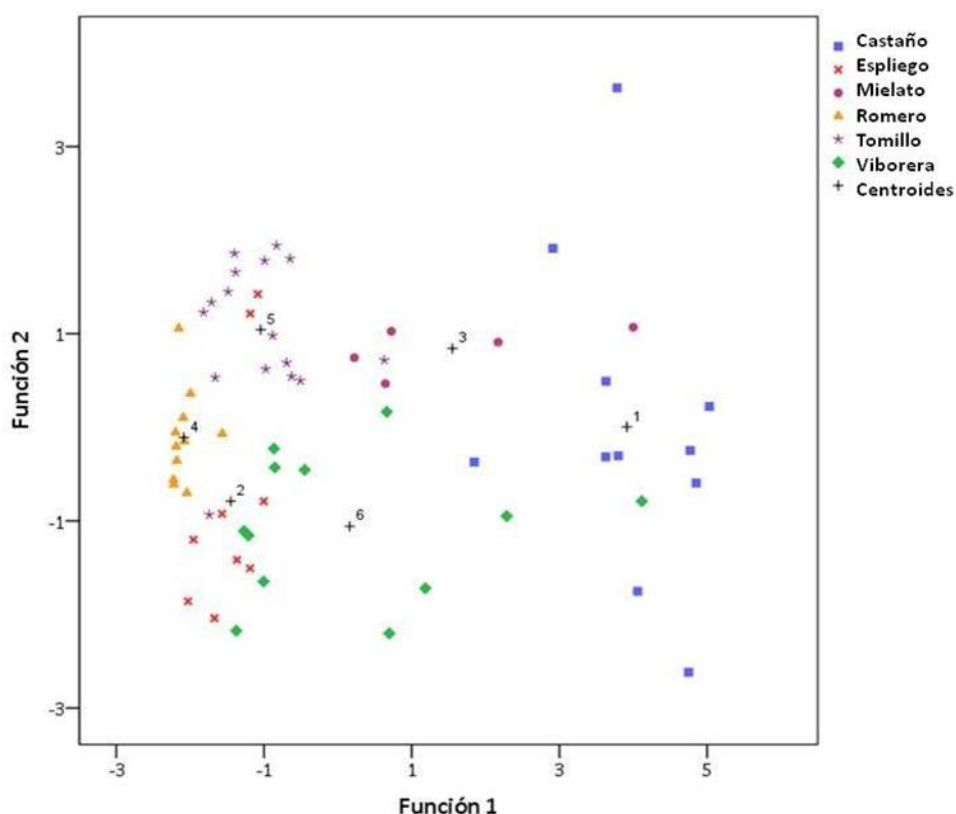


Figura II.23. Gráfico de funciones discriminantes

4.3.1. Colorimetría CIELAB

Como hemos comentado este ensayo de color sirve para determinar de forma objetiva y precisa las características colorimétricas de cada tipo de miel según el sistema espacio uniforme de color CIELAB, [CIE, 1986]. La colorimetría viene expresada en función de los siguientes parámetros: claridad o luminosidad: L^*_{10} , cromaticidad rojo/verde (a^*_{10}), cromaticidad amarillo/azul (b^*_{10}), croma ($C^*_{ab,10}$), tono ($h^*_{ab,10}$).

Como hemos comentado este ensayo de color sirve para determinar de forma objetiva y precisa las características colorimétricas de cada tipo de miel según el sistema espacio uniforme de color CIELAB, [CIE, 1986]. La colorimetría viene expresada en función de los siguientes parámetros: claridad o luminosidad: L^*_{10} , cromaticidad rojo/verde (a^*_{10}), cromaticidad amarillo/azul (b^*_{10}), croma ($C^*_{ab,10}$), tono ($h^*_{ab,10}$).

A continuación se comentarán cada uno de los parámetros de color así como los resultados obtenidos.

➤ **Claridad o Luminosidad (L^*_{10})**

Se simboliza como L^*_{10} y es el atributo de la sensación visual. Expresa la luminosidad de una superficie por comparación con otra que aparece como blanca o que posee un factor de transmisión muy elevado. Se aplica sólo a colores no aislados.

El parámetro L^*_{10} varía de 0 (negro) a 100 (blanco). Un valor positivo indica que el color es más claro que el modelo y al revés ocurre con un valor negativo, el color de la muestra sería más oscuro que el modelo. Todas las muestras presentaron valores de claridad positiva, las mieles de castaño son las de menor claridad, le siguen las de espliego, tomillo, mielato y viborera y las de romero las de mayor valor de L^*_{10} , tabla II.18.

En la “Contribución a la denominación de origen de la miel de la Alcarria” [Ortiz Valbuena, 1992], que proponía evaluar los parámetros de calidad de todas las mieles (mono y multiflorales) producida en la Alcarria y que luego fue recogido en la obra “Principales características de las miel de la Alcarria” [Ortiz Valbuena et al., 1996], el valor medio de este parámetro fue de 79 ± 7 , muy similar al obtenido en esta memoria para las mieles monoflorales producidas en esta comarca (romero, espliego y tomillo). En el pliego de condiciones modificado de D.O.P. miel de la Alcarria se amplió este valor hasta ≥ 55.0 [BOE nº299 de 9 de diciembre de 2010].

Tabla II.18. Luminosidad (L^*_{10}) de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desv. estánd.	Mínimo- Máximo
Romero	11	84.04	3.93	75.32 – 91.33
Espliego	9	80.53	4.67	74.70 – 88.96
Tomillo	16	72.67	9.00	49.74 – 84.34
Viborera	12	59.25	12.51	38.86 – 77.12
Castaño	11	40.39	6.50	33.38 – 52.84
Mielato	5	59.06	13.35	38.86 – 77.12

Los resultados obtenidos son mayores que los publicados por González-Miret et al., [2005] para mieles de romero (73 ± 12), espliego (67 ± 7), tomillo (54 ± 4), castaño (39 ± 3) y mielato (41 ± 6) de origen español. Estos autores relacionan los bajos niveles de L^*_{10} con las coloraciones más oscuras (castaño, mielato, brezo y aguacate) y los altos niveles de minerales y viceversa, bajos niveles de minerales (mieles de romero, espliego y azahar) con altos valores de claridad.

En otro estudio sobre mieles artesanales de Madrid [Sanz et al., 2004], donde casi la mitad de las muestras analizadas eran de viborera, el valor de claridad fue de 27, por tanto bastante más oscuras que las mieles de viborera de este estudio.

➤ **Cromaticidad rojo-verde (a^*_{10})**

Es un atributo de la sensación visual que permite evaluar el color percibido de una superficie como más o menos cromático. Según los valores del espacio de color CIELAB si el valor de a^*_{10} es >0 , el color es rojo y si es <0 es verde.

Los resultados se presentan en la tabla II.19. Los valores negativos que se observan en el límite inferior de los intervalos de las mieles de romero y espliego indican color verde, aunque la media está en valores positivos (rojo). Para el resto de las mieles todos los valores son positivos, lo que indica un color rojizo.

Tabla II.19. Cromaticidad rojo - verde (a^*_{10}) de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desv. estándar.	Mínimo- Máximo
Romero	11	0.37	0.80	(-0.29) – 2.14
Espliego	9	2.37	3.15	(-1.81) – 7.28
Tomillo	16	5.68	4.44	0.04 – 16.34
Viborera	12	13.30	10.13	3.25 – 34.50
Castaño	11	25.81	5.85	13.00 – 32.68
Mielato	5	20.93	4.84	16.18 – 28.05

En el pliego de condiciones de la D.O.P. Miel de la Alcarria el intervalo de este parámetro se encuentra entre $-2.0 \leq a^*_{10} \leq +22.0$ [BOE nº299 de 9 de diciembre de 2010]. Las mieles monoflorales producidas en la Alcarria (romero, espliego y tomillo)

cumplen esta especificación técnica. La media dada para la caracterización de la miel producida en la Alcarria fue de 3 ± 4 [Ortiz Valbuena et al., 1996].

En cambio los resultados obtenidos por González-Miret et al. [2005] muestran unas mieles de coloración mas rojiza que las aquí obtenidas, así para romero a^*_{10} es de 24 ± 2 ; espliego de 21 ± 4 y tomillo de 28 ± 2 . No ocurre lo mismo para las mieles de castaño (24 ± 2) y mielato (21 ± 6) cuyos valores de cromaticidad son bastante similares a los obtenidos en esta memoria.

En las mieles artesanales de viborera de la Comunidad de Madrid [Sanz et al., 2004], el valor de cromaticidad amarillo-verde, fue de 0.41, bastante menos amarillas que las mieles aquí presentadas y muy cercanas a la coloración verde.

➤ **Cromaticidad amarillo-azul (b^*_{10})**

Es la cualidad de una luz determinada por su longitud de onda dominante y su pureza. Para este parámetro si el valor de b^* es >0 el color es amarillo, y si es <0 es azul.

Tabla II.20. Color amarillo-azul (b^*_{10}) de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desv. estánd.	Mínimo- Máximo
Romero	11	22.17	6.64	13.46 – 36.48
Espliego	9	53.20	13.47	37.00 – 80.53
Tomillo	16	53.42	14.54	28.49 – 77.59
Viborera	12	56.23	11.78	41.45 – 72.28
Castaño	11	62.28	5.79	53.18 – 69.38
Mielato	5	73.80	2.46	71.26 – 77.25

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla II.20, todas las muestras estudiadas presentan color amarillo.

En el pliego de condiciones de la D. O. P. miel de la Alcarria no aparece este parámetro [BOE nº299 de 9 de diciembre de 2010]. En la caracterización de las mieles de esta comarca el valor medio de b^*_{10} es de 48 ± 17 , dato muy parecido a las mieles de

espliego y tomillo, y bastante superior a las de romero, es decir de tonalidad más amarillenta.

Comparando con otras mieles españolas [González-Miret et al., 2005], las mieles de Castilla-La Mancha, en concreto los romeros (49 ± 10) y espliegos (59 ± 6) son de una coloración más amarilla, mientras que las mieles de tomillo (43 ± 7), castaño (20 ± 3) y mielato (22 ± 10) presentan una coloración más tendente hacia el azul.

En cuanto a las mieles artesanales de Madrid [Sanz et al., 2004], donde casi la mitad de las muestras analizadas eran de viborera, el valor de cromaticidad es de 5.22, un valor de bastante menos amarillento que las aquí analizadas.

➤ **Croma (C^*_{ab})**

El Croma C^*_{ab} es igual al módulo del vector que une el punto representativo del color, proyectado sobre el plano a^* , b^* , con el centro de coordenadas, es decir, la distancia entre el centro y el punto proyectado sobre el plano de cromaticidad. El croma representa la cantidad de color, su medida está en relación con la distancia a las coordenadas de origen. Toma el valor 0 para estímulos acromáticos y normalmente no pasa de 150, aunque puede tomar valores superiores a 1000 para estímulos monocromáticos muy vivos.

Tabla II.21. Valores de Croma (C^*_{ab}) de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desv. estándar.	Mínimo- Máximo
Romero	11	22.19	6.67	13.46 – 36.51
Espliego	9	53.31	13.58	37.05 – 80.85
Tomillo	16	53.81	14.87	28.49 – 79.29
Viborera	12	58.23	13.57	42.10 – 75.03
Castaño	11	67.62	6.13	54.74 – 74.96
Mielato	5	76.83	2.65	73.79 – 80.77

Observando los resultados de la tabla II.21, las mieles con mayores valores de croma son las mieles más oscuras, mielato y castaño, y los de menor las más claras, las mieles de romero, espliego y tomillo.

La media obtenida para la caracterización de la miel producida en la Alcarria fue de 48 ± 18 [Ortiz Valbuena et al., 1996], algo menor que las mieles estudiadas de espliego y tomillo, y bastante superior a las de romero.

Los valores medios dados por González-Miret, et al. [2005], en cuanto a las mieles de tomillo (51 ± 5) son muy similares a los encontrados para las mieles de Castilla-La Mancha. No pasa lo mismo con el resto: castaño (31 ± 3), mielato (31 ± 11), espliego (63 ± 5), romero (52 ± 8) que difieren bastante con las de la zona estudiada.

➤ **Tono ($h_{ab,10}$)**

Se denomina tono o ángulo de tono, se simboliza como $h_{ab,10}$ y es el atributo de la sensación visual que permite apreciar en una superficie uno sólo de los colores rojo, amarillo, verde o azul, o una combinación de éstos. Se refiere a un estímulo luminoso. En el espacio CIELAB el ángulo de tono es aquel que forma el vector del punto que representa el color proyectado sobre el plano de cromaticidad a^* , b^* con el eje a^* positivo.

El ángulo de tono es uno de los parámetros más importantes para caracterizar el color. Es una magnitud derivada de las coordenadas colorimétricas a^*_{10} y b^*_{10} por la fórmula:

$$h^* = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

Varía entre 0° y 360° y, para los estímulos acromáticos ($a^*=b^*=0$) es indefinida.

Según se observa en la tabla II.22, las mieles con mayor ángulo de tono son las mieles de romero, espliego y tomillo, y las de menor $h_{ab,10}$, las de castaño.

En la publicación “Principales características de las miel de la Alcarria” [Ortiz Valbuena et al., 1996], el valor medio de este parámetro es de 87 ± 3 , similar a las mieles de la zona estudiadas. En el pliego de condiciones modificado de la D.O.P. miel de la Alcarria este valor debe ser como mínimo de 74.0 [BOE nº299 de 9 de diciembre de 2010], valor que está por debajo de todas las mieles monoflorales alcarreñas

estudiadas, próximo al valor encontrado para los mielatos y por encima del correspondiente a las mieles de castaño.

Tabla II.22 Tono (hab^*_{ab}) de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha. Unidad: grado sexagesimal (°).

Tipo de miel	n	Valor medio	Desv. estándar.	Mínimo- Máximo
Romero	11	89.32	1.59	85.95 – 91.03
Espliego	9	88.0	2.96	84.83 – 92.80
Tomillo	16	84.58	3.47	78.11 – 89.94
Viborera	12	77.87	7.19	62.01 – 86.05
Castaño	11	67.57	4.81	54.74 – 74.56
Mielato	5	74.21	3.55	68.55 – 77.34

En la publicación “Principales características de las miel de la Alcarria” [Ortiz Valbuena et al., 1996], el valor medio de este parámetro es de 87 ± 3 , similar a las mieles de la zona estudiadas. En el pliego de condiciones modificado de la D. O. P. miel de la Alcarria este valor debe ser como mínimo de 74.0 [BOE nº299 de 9 de diciembre de 2010], valor que está por debajo de todas las mieles monoflorales alcarreñas estudiadas, próximo al valor encontrado para los mielatos y por encima del correspondiente a las mieles de castaño.

Los valores obtenidos por González-Miret et al. [2005] en mieles de origen español fueron bastante más bajos que los aquí obtenidos (romero: 76 ± 13 ; espliego: 70 ± 5 ; tomillo: 57 ± 6 ; castaño: 40 ± 4 ; mielato: 44 ± 7).

En la figura II.24 se representan gráficamente los resultados de los parámetros $L^*_{ab,10}$, a^*_{10} y b^*_{10} de las mieles estudiadas.

4.3.2. Colorimetría PFUND

Es uno de los métodos más usados internacionalmente para determinar el color de la miel. Está basado en la comparación óptica, Pfund (Fell, 1978) o Lovibond (Aubert & Gonnet, 1983). Los valores de estos comparadores dan una medida de la intensidad de color, pero sólo del habitual tono ámbar de la miel. Los comparadores

Lovibond son más fáciles de manejar que los graduadores Pfund, aunque generalmente las medidas se dan en la escala de color Pfund [Bogdanov et al., 2004].

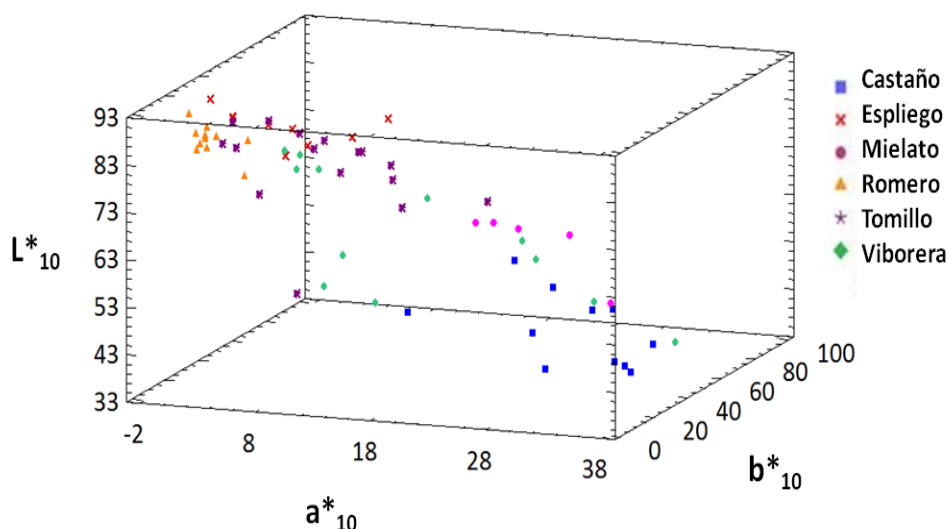


Figura II.24. Representación tridimensional de los parámetros $L^*_{ab,10}$, a^*_{10} , b^*_{10} de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

La medida del Pfund es algo subjetiva, la determinación se lleva a cabo por tres operadores y se calcula el valor medio. Para intentar dar un resultado objetivo de color el valor de Pfund se ha calculado a partir de las medidas espectrofotométricas del método CIELAB, para lo cual se hicieron un gran número de mediciones de color, tanto por el método CIELAB como por Pfund. Se buscó qué parámetro del método CIELAB se correlacionaba mejor con los datos de Pfund y se encontró la mejor correlación con el parámetro X_{10} ($R^2 = 94.1\%$) [González-Porto et al, 2008]¹.

La figura II.25 muestra la relación lineal obtenida, figura II.25 a), así como la gráfica de los valores de Pfund observados frente a los valores predichos por el

¹ En este estudio se emplearon además de las mieles estudiadas en esta Memoria, 12 mieles adicionales hasta un total de 76

modelo, figura II.25 b) . La tabla II.23 presenta los parámetros de la regresión y la tabla ANOVA.El modelo descrito se ha utilizado para dar los valores de Pfund. En la tabla II.24 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla II.23. Parámetros de regresión y tabla ANOVA.

		Error estándar	p-valor
Ordenada	131.89	5.22	0.0000
Pendiente	412.75	11.88	0.0000
r	0.9703		

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p-valor
Modelo	27999.9	1	27999.9	1206.61	0.0000
Residuos	1740.4	75	23.2055		
Falta de ajuste	1677.91	73	22.9851	0.74	0.7368
Error puro	62.5	2	31.25		

Tabla II.24. Color calculado en escala de Pfund (mm) de las distintas mieles monoflorales de Castilla-La Mancha

Tipo de miel	n	Valor medio	Desv. estándar.	Mínimo- Máximo
Romero	11	19	6	12 - 32
Espliego	9	41	13	28 - 66
Tomillo	16	47	7	29 - 57
Viborera	12	67	23	42 - 115
Castaño	11	97	12	73 - 111
Mielato	5	93	17	79 - 118

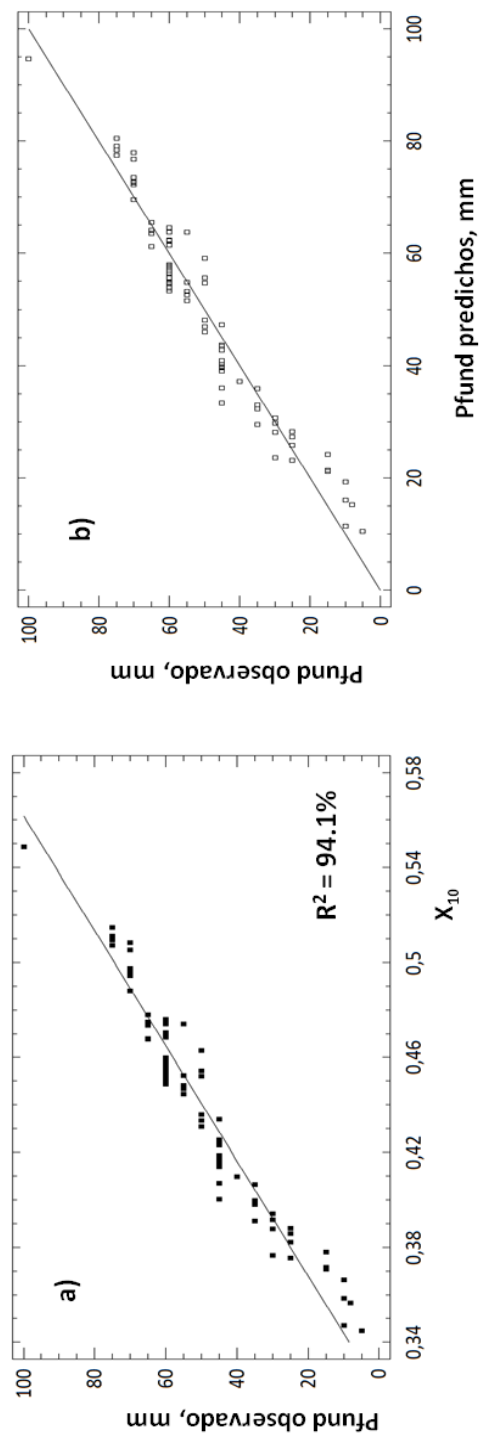


Figura II. 25. a) Modelo de ajuste lineal, b) Valores observados de Pfund frente a los valores predichos por el modelo

Como se puede observar, las mieles con un índice de Pfund más bajo, las más claras, son las de romero; le siguen las de espliego, tomillo y viborera; y las mieles con mayor Pfund y, por lo tanto, las más oscuras, son mielato y castaño.

Si comparamos con las medias europeas [Persano Oddo & Piro, 2004], vemos que la mayoría de las mieles de Castilla-La Mancha son algo más oscuras, excepto las mieles de tomillo que son más claras que la media europea: romero: 15 ± 6 ; espliego: 33 ± 6 ; tomillo: 53 ± 11 ; castaño: 88 ± 16 ; mielato: 86 ± 16 .

En un estudio de color de 7 tipos de mieles monoflorales españolas (romero, azahar espliego, eucaliptus, girasol, brezo y mielato) se obtuvo una buena correlación entre X_{10} y la graduación Pfund ($r = 0.958$) [Mateo et al., 1992]. Los resultados obtenidos por estos autores son superiores a los observados en la tabla II.24, con un valor de 23 mm de Pfund para las mieles de romero, 70 mm para espliego y 119 mm para mielato. Esta diferencia pudiera ser explicada en parte porque, aunque el origen geográfico exacto no viene reflejado, si se hace mención a que algunas muestras han sido sometidas a calentamiento, efecto que provoca oscurecimiento de las mieles, hecho que las mieles estudiadas no han sufrido ya que las mieles seleccionadas son crudas.

4.4. Discriminación de las mieles por su origen botánico, parte B

Una vez obtenidos los parámetros de color, se han realizado a) un análisis de componentes principales y b) un análisis lineal discriminante, con el objetivo de una mejor discriminación de los seis tipos de miel. Para ello se han utilizado todos los parámetros estudiados hasta ahora, a excepción del valor calculado de Pfund, es decir: HMF, humedad, acidez libre, pH, conductividad eléctrica, luminosidad (L^*_{10}), cromaticidad rojo/verde (a^*_{10}), cromaticidad amarillo/azul (b^*_{10}), croma ($C^*_{ab,10}$) y tono ($h^*_{ab,10}$).

4.4.1. Análisis de componentes principales, PCA

Para comenzar este análisis se elige el número de componentes principales con la ayuda de los gráficos de sedimentación y la tabla de autovalores, que muestra el porcentaje de varianza acumulada explicada. La tabla II.25 y la figura II.26 muestran

los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales para los valores medios de los diez parámetros estudiados para cada tipo de miel.

Tabla II.25. Autovalores y porcentaje de varianza para los cinco componentes principales

Componente número	Autovalor	Porcentaje de varianza	Porcentaje de varianza acumulada
1	7.60941	76.094	76.094
2	1.53742	15.374	91.468
3	0.61053	6.105	97.574
4	0.16121	1.612	99.186
5	0.08143	0.814	100.00

Como se observa en la tabla II.25, los dos primeros componentes principales explican el 91.5% de la varianza, y por otra parte, los valores más elevados del autovalor son los que corresponden a esos dos componentes. Paralelamente, en el gráfico de sedimentación se observa que el número de componentes a utilizar son dos. Fijados los dos primeros componentes, la tabla II.26 muestra la tabla de cargas o pesos de los componentes.

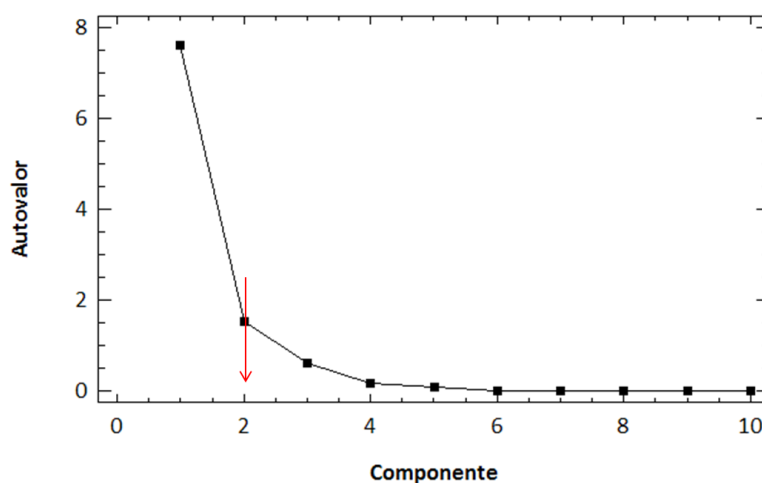


Figura II.26. Gráfico de sedimentación

Tabla II.26. Tabla de pesos de los componentes

	COMPONENTE 1	COMPONENTE 2
Acidez libre	0.32912	- 0.28960
Conductividad eléctrica	0.35592	- 0.05802
HMF	-0.05201	0.76250
Humedad	-0.31155	0.24176
pH	0.34120	- 0.16180
a^*_{10}	0.35645	0.07050
b^*_{10}	0.28842	0.35222
C^*_{ab}	0.30619	0.31967
L^*_{10}	- 0.34120	- 0.09127
$h^*_{ab,10}$	- 0.35205	- 0.08469

La figura II.27 resume de forma gráfica lo observado en la tabla de pesos de los componentes.

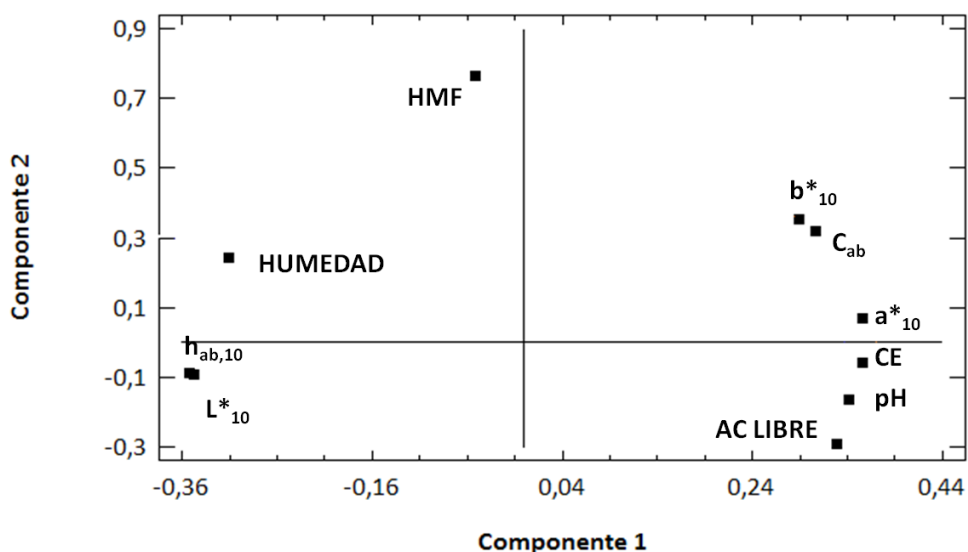


Figura II.27. Gráfico de cargas o pesos de los componentes

El primer componente, C1, está directamente correlacionado con la acidez libre, pH, conductividad eléctrica y cromaticidad rojo/verde (a^*_{10}). Su valor aumenta cuando aumentan los valores de estas variables, es decir, C1 explica una parte importante de la varianza asociada a los cuatro parámetros. El segundo componente, C2, tiene una

correlación directa muy fuerte con la variable HMF, en este caso explica casi toda la varianza asociada a la variable, y en mucha menor medida con la humedad. Las variables, cromaticidad amarillo/azul (b^*_{10}) y croma ($C^*_{ab,10}$) están directamente correlacionadas con ambos componentes principales casi a partes iguales. Las variables luminosidad (L^*_{10}) y tono ($h^*_{ab,10}$) estarían correlacionadas con el componente 3.

La figura II.28, gráfico doble o *biplot*, representa la superposición del gráfico de cargas con el diagrama de dispersión de las muestras en relación a los dos componentes.

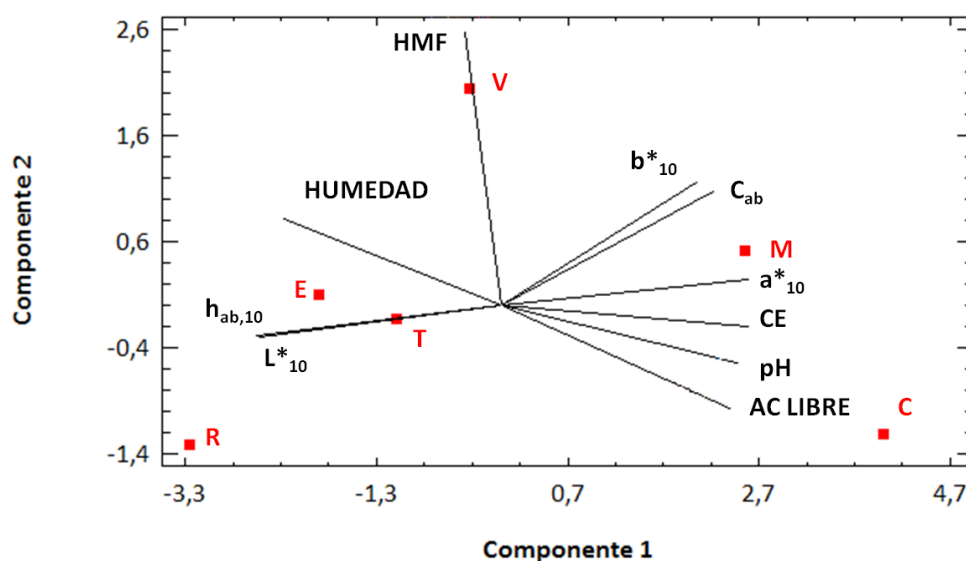


Figura II.28. Diagrama doble o biplot (C: castaño, E:espliego, M:mielatos, R:romero, T:tomillo, V:viborera)

Cada punto representa un conjunto de mieles según su origen botánico. Los puntos correspondientes a mieles de castaño y mielatos tienen valores elevados del componente principal 1 y, por lo tanto, se esperan para dichas muestras valores de acidez libre, pH, conductividad eléctrica y cromaticidad rojo/verde (a^*_{10}) elevados. De la misma forma, las mieles de la región de la Alcarria, romero, espliego y tomillo tendrán los valores más bajos de estas variables. Con respecto a las mieles de

viborera, de nuevo tienen un valor elevado del segundo componente principal y, por tanto, poseerán los mayores valores de HMF.

4.4.2. Análisis discriminante lineal, LDA

Con los diez parámetros medidos hasta ahora se ha realizado un análisis discriminante con el objetivo de mejorar la clasificación obtenida en el apartado 4.2.2 de los seis tipos de mieles. En este caso, se ha llevado a cabo un análisis por pasos o *stepwise*, para discriminar aquellas variables que tienen una mayor significación estadística en la clasificación. En este caso han resultado ser la conductividad eléctrica, cromaticidad amarillo/azul (b^*_{10}), luminosidad (L^*_{10}) y pH, en este orden.

Así se han introducido los 64 valores correspondientes a las diez variables para cada tipo de miel, y se han obtenido las funciones discriminantes, cuyos autovalores, correlación canónica, estadístico Lambda de Wilks y porcentaje de varianza se presentan en la tabla II.27.

Tabla II.27. Resumen del análisis discriminante

Función discriminante	Autovalor	Porcentaje de varianza	Correlación canónica	Lambda de Wilks	p-valor
1	6.17998	72.12	0.92775	0.02831	0.000
2	1.56203	18.23	0.78082	0.20329	0.000
3	0.69198	8.08	0.63951	0.52083	0.000
4	0.13476	1.57	0.34461	0.88124	0.025

Para valorar la significación estadística del conjunto de las cuatro funciones discriminantes obtenidas se estudian los diferentes estadísticos, Lambda de Wilks y su p-valor, los valores de la correlación canónica y los autovalores, y el porcentaje de la varianza total explicada. La tabla II.27 indica que, a pesar que el p-valor es inferior a 0.05 para las cuatro funciones discriminantes, las dos primeras son adecuadas para llevar a cabo la clasificación de los seis tipos de miel, con un 90.35% de varianza explicada, correlaciones canónicas cercanas a la unidad y valores del estadístico de Wilks próximos a cero. La tabla II.28 muestra la clasificación llevada a cabo para los seis tipos de mieles de acuerdo a las dos primeras funciones discriminantes, asimismo la figura II.29 muestra el gráfico de dichas funciones.

Obtener un porcentaje de tipos de miel correctamente clasificados del 76.7%, ratifica la significación estadística de las funciones discriminantes. Las mieles de romero son clasificadas en su totalidad, castaño, espliego, mielato, y tomillo presentan una correcta clasificación con porcentajes entre el 75 y el 90%, siendo las mieles de de viborera las peor clasificadas. Se puede concluir que los cuatro parámetros con significación estadística, conductividad eléctrica, luminosidad (L^*_{10}), cromaticidad amarillo/azul (b^*_{10}), y pH permiten una buena clasificación de las mieles en función del origen botánico.

Tabla II.28. Clasificación de los seis tipos de miel, en porcentaje

TIPO	GRUPO DE PERTENENCIA PRONOSTICADO					
	CASTAÑO	ESPLIEGO	MIELATO	ROMERO	TOMILLO	VIBORERA
CASTAÑO	90.9	0	9.1	0	0	0
ESPLIEGO	0	77.8	0	0	22.2	0
MIELATO	20.0	0	80.0	0	0	0
ROMERO	0	0	0	100	0	0
TOMILLO	0	0	6.3	12.5	75.0	6.2
VIBORERA	16.6	33.4	8.3	0	0	41.7

CLASIFICACIÓN CORRECTA: 76.7

Las mieles con D.O.P de La Alcarria mejoran su clasificación al introducir ciertos parámetros de color, al igual que las mieles de castaño. Por otro lado, mientras que la miel de mielato no sufre variación alguna, las mieles de tomillo y de viborera disminuyen algo su porcentaje de correcta clasificación al introducir los parámetros de color. En cualquier caso, a la vista de la gran variabilidad observada, en función del tipo de miel, para los diferentes parámetros medidos hasta ahora, el porcentaje de clasificación obtenido (75 – 76.7) puede considerarse correcto.

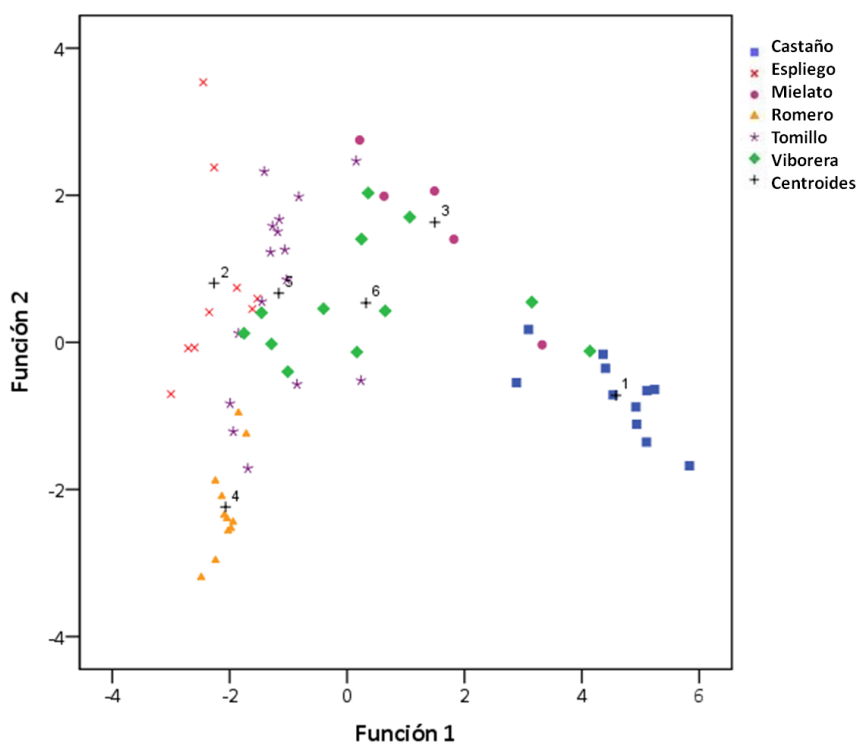


Figura II.28. Gráfico de funciones discriminantes

4.5. Perfiles palinológicos de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha

En las tablas II.29 hasta la II.34 se han resumido los resultados de los espectros polínicos a nivel cualitativo y cuantitativo de las variedades de miel estudiadas.

Para el **análisis polínico cualitativo** se representan los porcentajes medios del número de granos de polen de cada tipo polínico o taxón (del total de taxones), denominado abundancia relativa de clases. Según la mayor o menor abundancia relativa de cada taxón, estos se agrupan en las siguientes clases de dominancia [Louveaux et al., 1978]:

- Polen principal o dominante (P), es el tipo polínico que aporta más de un 45% del polen total. Lleva a dar la monofloralidad a una miel. En el caso de plantas como las labiadas o Citrus, que producen muy poco polen (infrarrepresentado), este porcentaje baja hasta un 15%. En otros casos, como en el árbol del castaño o del eucalipto, es al revés, son plantas muy poliníferas, cuyo polen en la miel esta suprarrepresentado, es decir tiene mucho polen para el néctar que han aportado a la miel. En este tipo de mieles la monofloralidad se considera si los porcentajes son mucho más elevados del 45%. Su límite exacto va a depender del tipo de planta.
- Polen secundario (S), es el polen o pólenes acompañantes del taxón principal cuya representación en la muestra de miel está entre un 16% y un 44%.
- Polen importante minoritario (IM), corresponde a pólenes que representan entre un 3% y un 15% de la composición polínica de la miel.
- Polen minoritario (M), son tipos polínicos que aparecen en la miel pero de influencia composicional baja. Representan entre un 1% y un 3%.

También se refleja en las tablas con qué frecuencia aparecen estos tipos polínicos en las muestras de cada tipo de miel, ya que cada muestra es cosechada en parajes que, aunque sean similares entre sí, presentan sus peculiaridades botánicas, por lo que es interesante conocer que taxones se repiten más en cada tipo de miel; dicho de otra forma, conocer cuáles son los taxones que normalmente acompañan al polen principal en una miel de origen botánico, e incluso geográfico, definido.

Al final de cada tabla se indica el **análisis polínico cuantitativo** que tiene como objetivo conocer la cantidad total de sedimento por unidad de peso. Su valoración permite aproximarse al modo de extracción e indica la presencia de mieles ricas o pobres en polen, lo que está directamente relacionado con la presencia de especies supra o infrarrepresentadas. Para la expresión de estos resultados normalmente se sigue el método de Maurizio [Maurizio, 1939; Von der Ohe et al., 2004] que establece según el número de granos de polen presentes en el residuo por gramo de miel, las siguientes clases:

- **Clase I:** >2000 granos de polen/g de miel. Son mieles monoflorales de pólenes infrarrepresentados.

Capítulo II. Caracterización de mieles monoflorales producidas en Castilla-La Mancha

- **Clase II:** entre 2000 – 10000 granos de polen/g de miel. Incluyen la mayoría de las mieles monoflorales, mielatos y mezclas de mieles florales y mielatos.
- **Clase III:** entre 10000 – 50000 granos de polen/g de miel. Mieles monoflorales de pólenes suprarrepresentados y mieles de mielato.
- **Clase IV:** entre 50000 – 100000 granos de polen/g de miel. Corresponde a mieles monoflorales de pólenes muy suprarrepresentados y mieles sometidas a prensado.
- **Clase V:** >100000 granos de polen/g de miel. Incluye mayoritariamente mieles prensadas.

La clase de Maurizio media a la que pertenece cada variedad de miel está recogida en la última fila de cada tabla de resultados polínicos.

A continuación se van desgranando los resultados obtenidos en el análisis polínico cualitativo y cuantitativo por tipo de miel.

➤ Miel de ROMERO

Se han estudiado 11 muestras monoflorales de romero de la región de la Alcarria (tabla II.29.). En la evaluación del **análisis cualitativo** se han contabilizado en estas mieles hasta 41 tipos polínicos diferentes con un porcentaje mayor del 1% de frecuencia relativa, pertenecientes a un total de 22 familias.

Abundancia relativa: el polen principal o predominante (P) es el de la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*), con una media de un 41%. Es un porcentaje bastante elevado en relación al mínimo requerido para conseguir la monofloralidad de este taxón (15%), lo que indica una gran riqueza de néctar de esta planta en las muestras estudiadas.

Como pólenes secundarios (S), acompañantes del principal aparecen *Hypocoum*, “otras Leguminosae” y “otros *Quercus*”.

De pólenes englobados como de importancia minoritaria (IM) se localizan 15 tipos polínicos, los más representados en las muestras son los tipo *Raphanus*, *Quercus ilex*, *Thymus* y Cistaceae, que aparecen en el 75% de las muestras.

Por último, se han encontrado 22 taxones del tipo minoritario (M). Estos pólenes son menos importantes de cara al perfil palinológico del tipo de miel debido a que no aparecen en el total de las muestras, por lo que únicamente van a reflejar particularidades botánicas y geográficas de cada muestra, más que ser representantes fijos en la miel de romero.

Frecuencia de aparición en las muestras: los taxones que aparecen en un mayor número de muestras, además de romero, son: tomillo y “otras Cistaceae” (diferentes de *Cistus ladanifer*) en un 91% de las muestras estudiadas. Como otros pólenes importantes se presentan *Raphanus* t., *Quercus ilex* t., *Hypecoum*, “otras Leguminosae” (distintas del resto de taxones de esa familia que no se mencionan como un taxón en particular), *Crataegus* t. y *Salix*, que son detectadas en más del 70% de las muestras.

Tabla II.29. Características palinológicas de la **miel de romero** de la Alcarria.

FAMILIA O SUBFAMILIA	TIPOS POLÍNICOS	Abundancia relativa ¹		Frecuencia de aparición ³ , %
		Media, %	Carácter ²	
BORAGINACEAE	<i>Echium</i>	4	IM	9
	Otras Boraginaceae	3	M	64
CAMPANULACEAE	<i>Campanula</i>	1	M	9
CAPRIFOLIACEAE	<i>Lonicera</i>	2	M	9
CICHORIOIDEAE	Cichorioideae	2	M	55
CISTACEAE	<i>Cistus ladanifer</i>	1	M	36
	<i>Helianthemum</i> t.	-	-	-
	Otras Cistaceae	6	IM	91
CRUCIFERAE (BRASSICACEAE)	<i>Raphanus</i> t.	11	IM	82
ASTEROIDEAE	<i>Carduus</i> t.	-	-	-
	<i>Centaurea</i> t.	-	-	-
	<i>Helianthus</i>	4	IM	64
	<i>Senecio</i> t.	-	-	-
	Otras Asteroideae	2	M	55
CONVOLVULACEAE	<i>Convolvulus</i>	-	-	-
CUPRESSACEAE	<i>Juniperus</i>	4	IM	64
CHENOPODIACEAE	Chenopodiaceae	1	M	9
ERICACEAE	Ericaceae	1	M	9
FAGACEAE	<i>Castanea sativa</i>	2	M	9
	<i>Quercus ilex</i> t.	12	IM	82
	<i>Quercus suber</i> t.	-	-	-

Tabla II.29. (continuación)

FAMILIA O SUBFAMILIA	TIPOS POLÍNICOS	Abundancia relativa ¹		Frecuencia de aparición ³ , %
		Media, %	Carácter ²	
LABIATAE	Otros <i>Quercus</i>	16	S	64
	<i>Lamium</i>	6	IM	11
	<i>Lavandula latifolia</i>	1	M	18
	<i>Lavandula stoechas</i>	2	M	9
	<i>Mentha</i>	-	-	-
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	41	P	100
	<i>Salvia</i>	-	-	-
	<i>Satureja</i>	-	-	-
	<i>Thymus</i>	12	IM	91
	<i>Teucrium</i>	-	-	-
LEGUMINOSAE	Otras Labiatae	-	-	-
	<i>Medicago</i>	-	-	-
	<i>Cytisus</i> t.	5	IM	27
	<i>Lotus</i> t.	1	M	9
	<i>Retama</i> t.	12	IM	27
	<i>Trifolium</i> t.	1	M	9
	<i>Vicia</i> t.	1	M	9
	Otras Leguminosae	18	S	73
LILIACEAE	Liliaceae	-	-	-
MYRTACEAE	<i>Eucalyptus</i>	-	-	-
OLEACEAE	<i>Olea europea</i>	2	M	9
	Otras Oleaceae	2	M	9
OXALIDACEAE	<i>Oxalis</i>	-	-	-
PAPAVERACEAE	<i>Hypecoum</i>	20	S	82
	Otras Papaveraceae	5	IM	45
PINACEAE	<i>Pinus</i> t.	1	M	27
PLANTAGINACEAE	<i>Plantago</i>	-	-	-
GRAMINEAE (POACEAE)	Poaceae	1	M	9
POLYGONACEAE	<i>Rumex</i>	-	-	-
RANUNCULACEAE	<i>Ranunculus</i>	-	-	-
RESEDACEAE	Resedaceae	-	-	-
RHAMNACEAE	Rhamnaceae	1	M	36
ROSACEAE	<i>Crataegus monogyna</i> t.	5	IM	73
	<i>Prunus</i> t.	2	M	36
	<i>Rubus</i> t.	5	IM	45
	Otras Rosaceae	3	IM	45
SALICACEAE	<i>Salix</i>	9	IM	73
UMBELLIFERAE	Umbelliferae	2	M	45

Análisis polínico CUANTITATIVO*: clase II de Maurizio

¹ Abundancia relativa de clases (%): valor medio del número de granos de polen encontrados de cada tipo polínico del total de taxones.

² Carácter o clase de dominancia: P = polen principal (>45%), S = polen secundario (16 % - 45%), IM = polen importante minoritario (3% - 15%), M= polen minoritario (1% - 3%).

³ Frecuencia de aparición (%): Porcentaje de la presencia del tipo polínico en las muestras.

* Las mieles de este tipo pertenecen mayoritariamente a la Clase que se indica

➤ Miel de ESPLIEGO

Se han estudiado 9 muestras monoflorales de espliego de la región de la Alcarria (tabla II.30). En el **análisis cualitativo** de estas mieles se han contabilizado hasta 42 tipos polínicos diferentes con un porcentaje mayor del 1% de frecuencia relativa, pertenecientes a un total de 22 familias.

Tabla II.30. Características palinológicas de la **miel de espliego** de la Alcarria

FAMILIA O SUBFAMILIA	TIPOS POLÍNICOS	Abundancia relativa ¹		Frecuencia de aparición ³ , %
		Media, %	Carácter ²	
BORAGINACEAE	<i>Echium</i>	8	IM	50
	Otras Boraginaceae	-	-	-
CAMPANULACEAE	<i>Campanula</i>	-	-	-
CAPRIFOLIACEAE	<i>Lonicera</i>	3	M	50
CICHORIOIDEAE	Cichorioideae	2	M	60
CISTACEAE	<i>Cistus ladanifer</i>	-	-	-
	<i>Helianthemum</i> t.	2	M	10
	Otros Cistaceae	2	M	70
CRUCIFERAE (BRASSICACEAE)	<i>Brassica</i> t.	9	IM	60
ASTEROIDEAE	<i>Carduus</i> t.	1	M	50
	<i>Centaurea</i> t.	-	-	-
	<i>Helianthus</i>	-	-	-
	<i>Senecio</i> t.	-	-	-
	Otras Asteroideae	10	IM	60
CONVOLVULACEAE	<i>Colvolvulus</i>	-	-	-
CUPRESSACEAE	<i>Juniperus</i>	1	M	50
CHENOPODIACEAE	Chenopodiaceae	4	IM	10
ERICACEAE	Ericaceae	1	M	10
EUPHORBIACEAE	<i>Euphorbia</i>	-	-	-
FAGACEAE	<i>Castanea sativa</i>	-	-	-
	<i>Quercus ilex</i> t.	6	IM	70
	<i>Quercus suber</i> t.	7	IM	50
	Otros <i>Quercus</i>	-	-	-
LABIATAE	<i>Lamium</i>	5	IM	40
	<i>Lavandula latifolia</i>	29	P	100
	<i>Lavandula stoechas</i>	1	M	20
	<i>Mentha</i>	1	M	30
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	4	IM	40
	<i>Salvia</i>	1	M	40
	<i>Satureja</i>	1	M	50
	<i>Thymus</i>	4	IM	60
	<i>Teucrium</i>	2	M	10
	Otras Labiatae	-	-	-

Tabla II.30. (continuación)

FAMILIA O SUBFAMILIA	TIPOS POLÍNICOS	Abundancia relativa ¹		Frecuencia de aparición ³ , %
		Media, %	Carácter ²	
LEGUMINOSAE	<i>Medicago</i>	-	-	-
	<i>Cytisus</i> t.	7	IM	50
	<i>Lotus</i> t.	6	IM	60
	<i>Retama</i> t.	3	M	60
	<i>Trifolium</i> t.	2	M	20
	<i>Vicia</i> t.	-	-	-
	Otras Leguminosae	13	IM	70
LILIACEAE	Liliaceae	2	M	60
MYRTACEAE	<i>Eucalyptus</i>	-	-	-
OLEACEAE	<i>Olea europea</i>	1	M	20
	Otras Oleaceae	3	M	20
OXALIDACEAE	<i>Oxalis</i>	-	-	-
PAPAVERACEAE	<i>Hypecoum</i>	5	IM	60
	Otras Papaveraceae	2	M	50
PINACEAE	<i>Pinus</i> t.	-	-	-
PLANTAGINACEAE	<i>Plantago</i>	3	M	50
GRAMINEAE (POACEAE)	Poaceae	-	-	-
POLYGONACEAE	<i>Rumex</i>	-	-	-
RANUNCULACEAE	<i>Ranunculus</i>	-	-	-
RESEDACEAE	Resedaceae	4	IM	10
RHAMNACEAE	Rhamnaceae	1	M	20
ROSACEAE	<i>Crataegus monogyna</i> t.	1	M	20
	<i>Prunus</i> t.	3	M	30
	<i>Rubus</i> t.	5	IM	70
	Otras Rosaceae	4	IM	80
	<i>Salix</i>	2	M	50
SALICACEAE	<i>Salix</i>	2	M	50
SCROPHULARIACEAE	Scrophulariaceae	1	M	30
UMBELLIFERAE	Umbelliferae	1	M	40

Análisis polínico CUANTITATIVO*: clase II de Maurizio

¹ Abundancia relativa de clases (%): valor medio del número de granos de polen encontrados de cada tipo polínico del total de taxones.

² Carácter o clase de dominancia: P = polen principal (>45%), S = polen secundario (16 % - 45%), IM = polen importante minoritario (3% - 15%), M= polen minoritario (1% - 3%).

³ Frecuencia de aparición (%): Porcentaje de la presencia del tipo polínico en las muestras.

* Las mieles de este tipo pertenecen mayoritariamente a la Clase que se indica

Abundancia relativa: según su espectro polínico el polen principal o predominante (P) es el de la planta de espliego *Lavandula latifolia*, que presenta un valor medio de 29%, un porcentaje bastante elevado para el mínimo requerido para la

monofloralidad de este tipo (10%¹), lo que indica una elevada riqueza de néctar de espliego en estas muestras.

En estas mieles no hay ningún polen que tenga una abundancia relativa suficiente como para considerarlo polen secundario (S).

De pólenes englobados como de importancia minoritaria (IM) se localizan 16 tipos polínicos. Los taxones que más aparecen en las muestras son: *Rubus* y “otras Rosaceae”, *Hypocoum*, tipo *Quercus ilex*, *Lotus* t. y “otras Leguminosae”, *Thymus* y *Brassica* t.

Por último, entre los pólenes minoritarios (M) que con mayor frecuencia aparecen en esta variedad de miel se encuentran: *Retama* t., Liliaceae, Cichorioideae y “otras Cistaceae”.

Frecuencia de aparición en las muestras: Los taxones que aparecen en un mayor número de muestras, además de espliego (*Lavandula latifolia*), son “otras Rosaceae” en un 80% de las muestras estudiadas, y como otros pólenes con representación importante se reflejan *Quercus ilex* t, *Rubus* t., “otras Leguminosae” y “otras Cistaceae” que son detectadas en un 70% de las mieles.

En cuanto al **análisis cuantitativo**, al igual que pasa con las mieles de romero, la media de estas mieles está en la clase II, más acorde con mieles multiflorales que las monoflorales de polen infrarrepresentado [Von der Ohe et al., 2004] que es donde debería aparecer una miel de labiada. La diferencia con las mieles de romero es que, en este caso, todas las muestras están repartidas entre la clase I y II, y que ninguna supera los 10000 granos de polen/g de miel (clase III de Maurizio).

➤ Miel de TOMILLO

Se han estudiado 32² muestras monoflorales de tomillo de la comarca de la Alcarria (Tabla II.31.). En el **análisis cualitativo** de estas mieles se han contabilizado

¹Según la Resolución del 10 de noviembre de 2010, de la Dirección General de Industria y Mercados Alimentarios, por la que se concede la protección nacional transitoria a la modificación de la D.O.P. «Miel de La Alcarria», actualmente, para dar como monofloral una miel de espliego, no es necesario que la abundancia relativa sea de un 15%, con un 10% de *Lavandula latifolia* Medicus es suficiente.

hasta 49 tipos polínicos diferentes con un porcentaje mayor del 1% de frecuencia relativa, pertenecientes a un total de 26 familias.

Abundancia relativa: el polen principal o predominante (P) es el proveniente del tomillo (*Thymus* spp.) Las muestras presentan una abundancia media de un 24%, un porcentaje bastante por encima del mínimo requerido para la monofloralidad (15%), lo que indica una gran riqueza de néctar de tomillo en estas muestras.

Como polen secundario (S) aparece el grupo de “otras Leguminosae”.

Se presentan unos 23 tipos polínicos englobados como de carácter importante (IM). Los que más aparecen en las muestras pertenecen al tipo *Quercus ilex*, “otras Cistaceae”, *Rosmarinus officinalis*, *Hypocoum*, y los tipos *Brassica*, *Crataegus monogyna*, *Lotus* y *Trifolium*.

Entre los 24 taxones minoritarios (M) los que aparecen con mayor frecuencia en esta variedad de miel son los tipos *Cytisus*, *Quercus suber* y “otras Boraginaceae”, que se presentan en el entorno del 50% de las muestras.

Frecuencia de aparición en las muestras: Los taxones que aparecen en, al menos, el 70% de las muestras, además de tomillo (*Thymus* spp.), son: *Quercus ilex* t, “otras Cistaceae”, *Rosmarinus officinalis*, *Hypocoum*, “otras Leguminosae”, *Brassica* t. y *Crataegus monogyna* t.

En cuanto al **análisis cuantitativo**, al igual que pasa con los anteriores tipos de mieles pertenecientes a la familia de las labiadas, la media de estas mieles está en la clase II. En este caso, excepto una muestra que se engloba en la clase III, el resto están entre la clase I y II de Maurizio.

² No se tiene en cuenta una muestra de miel de tomillo cosechada en septiembre (s-6841), ya que lo normal es cosechar este tipo de miel en primavera, como ocurre en el resto de muestras. La flora va a ser muy diferente, lo que podría distorsionar los resultados del total.

Tabla II.31. Características palinológicas de la miel de tomillo de la Alcarria.

FAMILIA O SUBFAMILIA	TIPOS POLÍNICOS	Abundancia relativa ¹		Frecuencia de aparición ³ , %
		Media, %	Carácter ²	
BORAGINACEAE	<i>Echium</i>	8	IM	51
	Otras Boraginaceae	3	M	49
CAMPANULACEAE	<i>Campanula</i>	2	M	6
CAPRIFOLIACEAE	<i>Lonicera</i>	-	-	-
CICHORIOIDEAE	<i>Cichorioideae</i>	2	M	14
CISTACEAE	<i>Cistus ladanifer</i>	-	-	-
	<i>Helianthemum</i> t.	6	IM	20
	Otros Cistaceae	10	IM	89
CRUCIFERAE				
(BRASSICACEAE)	<i>Brassica</i> t.	13	IM	74
ASTEROIDEAE	<i>Carduus</i> t.	2	M	34
	<i>Centaurea</i> t.	2	M	26
	<i>Helianthus</i>	2	M	6
	<i>Senecio</i> t.	-	-	-
	Otras Asteroideae	2	M	23
CONVOLVULACEAE	<i>Colvolvulus</i>	1	M	11
CUPRESSACEAE	<i>Juniperus</i>	2	M	17
CHENOPODIACEAE	<i>Chenopodiaceae</i>	-	-	-
ERICACEAE	<i>Ericaceae</i>	-	-	-
EUPHORBIACEAE	<i>Euphorbia</i>	3	M	11
FAGACEAE	<i>Castanea sativa</i>	-	-	-
	<i>Quercus ilex</i> t.	11	IM	94
	<i>Quercus suber</i> t.	3	M	51
	Otros <i>Quercus</i>	-	-	-
LABIATAE	<i>Lamium</i>	-	-	-
	<i>Lavandula latifolia</i>	3	M	29
	<i>Lavandula stoechas</i>	7	IM	29
	<i>Mentha</i>	2	M	14
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	8	IM	83
	<i>Salvia</i>	-	-	-
	<i>Satureja</i>	4	IM	11
	Thymus	24	P	100
	<i>Teucrium</i>	6	IM	17
	Otras Labiatae	-	-	-
LEGUMINOSAE	<i>Medicago</i>	5	IM	11
	<i>Cytisus</i> t.	2	M	63
	<i>Lotus</i> t.	6	IM	60
	<i>Retama</i> t.	5	IM	23
	<i>Trifolium</i> t.	6	IM	66
	<i>Vicia</i> t.	5	IM	11
	Otras Leguminosae	17	S	77

Tabla II.31. (continuación)

FAMILIA O SUBFAMILIA	TIPOS POLÍNICOS	Abundancia relativa ¹		Frecuencia de aparición ³ , %
		Media, %	Carácter ²	
LILIACEAE	Liliaceae	2	M	6
MYRTACEAE	<i>Eucalyptus</i>	-	-	-
OLEACEAE	<i>Olea europea</i>	11	IM	40
	Otras Oleaceae	1	M	6
OXALIDACEAE	<i>Oxalis</i>	2	M	20
PAPAVERACEAE	<i>Hypecoum</i>	11	IM	80
	Otras Papaveraceae	2	M	40
PINACEAE	<i>Pinus</i> t.	-	-	-
PLANTAGINACEAE	<i>Plantago</i>	1	M	11
GRAMINEAE (POACEAE)	Poaceae	1	M	6
POLYGONACEAE	<i>Rumex</i>	1	M	9
RANUNCULACEAE	<i>Ranunculus</i>	1	M	9
RESEDACEAE	Resedaceae	3	M	9
RHAMNACEAE	Rhamnaceae	1	M	17
ROSACEAE	<i>Crataegus monogyna</i> t.	6	IM	71
	<i>Prunus</i> t.	8	IM	43
	<i>Rubus</i> t.	4	IM	46
	Otras Rosaceae	4	IM	46
SALICACEAE	<i>Salix</i>	8	IM	54
SCROPHULARIACEAE	Scrophulariaceae	9	IM	40
UMBELLIFERAE	Umbelliferae	6	IM	14

Análisis polínico CUANTITATIVO*: clase II de Maurizio

¹ Abundancia relativa de clases (%): valor medio del número de granos de polen encontrados de cada tipo polínico del total de taxones.

² Carácter o clase de dominancia: P = polen principal (>45%), S = polen secundario (16 % - 45%), IM = polen importante minoritario (3% - 15%), M= polen minoritario (1% - 3%).

³ Frecuencia de aparición (%): Porcentaje de la presencia del tipo polínico en las muestras.

* Las mieles de este tipo pertenecen mayoritariamente a la Clase que se indica

En función de estos resultados, podemos concluir que las mieles de labiadas de la Alcarria tienen mayor número de granos de polen de lo esperado (característica infrarrepresentación polínica de esta familia) y que está en relación con la alta proliferación en esta comarca del género *Hypecoum* y, por tanto, la elevada representación del polen de esta planta en éstas mieles.

➤ Miel de VIBORERA

Se han estudiado 12 muestras monoflorales de viborera producidas en Toledo y Ciudad Real (tabla II.32.). En el **análisis cualitativo** de estas mieles se han contabilizado

hasta 36 tipos polínicos diferentes con un porcentaje mayor del 1% de frecuencia relativa, pertenecientes a un total de 19 familias.

Abundancia relativa: el polen principal (P) es el de la planta denominada viborera (*Echium*). Presenta una abundancia media del 73%. En este estudio, se consideró la abundancia relativa mínima para considerar la miel como monofloral de viborera, en un 45%. Pero como pudimos observar en 5 de las muestras, la abundancia relativa de *Echium* representaba más del 90% del polen, lo que nos indicaría que este tipo polínico es más bien del tipo suprarrepresentado que de representación normal, por lo que posiblemente sería más lógico establecer un mínimo de un 60% para clasificarlo monofloral, que el 45% considerado.

No aparece polen secundario (S), debido principalmente a dicha suprarrepresentación de *Echium*, hace difícil que otro polen alcance porcentajes de más de un 16%, siendo la tendencia a que los pólenes acompañantes de esta planta parezcan menos representados que si la abundancia del polen principal no fuese tan elevado.

De pólenes englobados como de importancia minoritaria (IM) hay 6 tipos polínicos. Los que más aparecen en las muestras son: *Hypocoum*, “otras Cistaceae” y “otras Leguminosae”

Por último, hay una gran variedad de pólenes minoritarios (M). Este hecho, puede considerarse lógico en función de lo comentado en relación con la suprarrepresentación de *Echium*, que no deja lugar a porcentajes altos de otros taxones. Los tipos polínicos que aparecen con mayor frecuencia en esta variedad de miel son: *Quercus ilex* t., *Lavandula stoechas*, *Brassica* t., *Rubus* t., *Cistus ladanifer* y *Rosmarinus officinalis*.

Tabla II.32. Características palinológicas de la miel de viborera de Toledo y Ciudad Real.

FAMILIA O SUBFAMILIA	TIPOS POLÍNICOS	Abundancia relativa ¹		Frecuencia de aparición ³ , %
		Media, %	Carácter ²	
BORAGINACEAE	<i>Echium</i>	73	P	100
	Otras Boraginaceae	3	M	33
CAMPANULACEAE	Campanulaceae	2	M	53
CAPRIFOLIACEAE	<i>Lonicera</i>	-	-	-
CICHORIOIDEAE	Cichorioideae	1	M	40
CISTACEAE	<i>Cistus ladanifer</i>	3	M	60
	<i>Helianthemum</i> t.	-	-	-
	Otras Cistaceae	4	IM	80
CRUCIFERAE (BRASSICACEAE)	<i>Brassica</i> t.	3	M	87
ASTEROIDEAE	<i>Carduus</i> t.	-	-	-
	<i>Centaurea</i> t.	-	-	-
	<i>Helianthus</i>	2	M	7
	<i>Senecio</i> t.	-	-	-
	Otras Asteroideae	1	M	53
CONVOLVULACEAE	Colvolvulus	-	-	-
CUPRESSACEAE	<i>Juniperus</i>	-	-	-
CHENOPODIACEAE	Chenopodiaceae	-	-	-
ERICACEAE	Ericaceae	2	M	27
EUPHORBIACEAE	<i>Euphorbia</i>	-	-	-
FAGACEAE	<i>Castanea sativa</i>	7	IM	33
	<i>Quercus ilex</i> t.	3	M	93
	<i>Quercus suber</i> t.	-	-	-
	Otros <i>Quercus</i>	2	M	40
LABIATAE	<i>Lamium</i>	-	-	-
	<i>Lavandula latifolia</i>	-	-	-
	<i>Lavandula stoechas</i>	2	M	87
	<i>Mentha</i>	-	-	-
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	2	M	60
	<i>Salvia</i>	-	-	-
	<i>Satureja</i>	-	-	-
	<i>Thymus</i>	1	M	33
	<i>Teucrium</i>	-	-	-
	Otras Labiatae	1	M	13
LEGUMINOSAE	<i>Medicago</i>	-	-	-
	<i>Cytisus</i> t.	1	M	47
	<i>Lotus</i> t.	1	M	20
	<i>Retama</i> t.	4	IM	33
	<i>Trifolium</i> t.	2	M	40
	<i>Vicia</i> t.	2	M	13
	Otras Leguminosae	7	IM	60

Tabla II.32. (continuación)

FAMILIA O SUBFAMILIA	TIPOS POLÍNICOS	Abundancia relativa ¹		Frecuencia de aparición ³ , %
		Media, %	Carácter ²	
LILIACEAE	Liliaceae	0	M	13
MYRTACEAE	<i>Eucalyptus</i>	4	IM	33
OLEACEAE	<i>Olea europea</i>	2	M	27
	Otras Oleaceae	3	M	13
OXALIDACEAE	<i>Oxalis</i>	0	M	20
PAPAVERACEAE	<i>Hypecoum</i>	12	IM	60
	Otras Papaveraceae	0	M	20
PINACEAE	<i>Pinus</i> t.	-	-	-
PLANTAGINACEAE	<i>Plantago</i>	-	-	-
GRAMINEAE (POACEAE)	Poaceae	1	M	13
POLYGONACEAE	<i>Rumex</i>	1	M	7
RANUNCULACEAE	<i>Ranunculus</i>	-	-	-
RESEDACEAE	Resedaceae	-	-	-
RHAMNACEAE	Rhamnaceae	1	M	13
ROSACEAE	<i>Crataegus monogyna</i> t.	2	M	13
	<i>Prunus</i> t.	2	M	40
	<i>Rubus</i> t.	2	M	67
	Otras Rosaceae	1	M	27
SALICACEAE	<i>Salix</i>	1	M	47
SCROPHULARIACEAE	Scrophulariaceae	-	-	-
UMBELLIFERAE	Umbelliferae	1	M	33

Análisis polínico CUANTITATIVO*: clase III de Maurizio

¹ Abundancia relativa de clases (%): valor medio del número de granos de polen encontrados de cada tipo polínico del total de taxones.

² Carácter o clase de dominancia: P = polen principal (>45%), S = polen secundario (16 % - 45%), IM = polen importante minoritario (3% - 15%), M= polen minoritario (1% - 3%).

³ Frecuencia de aparición (%): Porcentaje de la presencia del tipo polínico en las muestras.

* Las mieles de este tipo pertenecen mayoritariamente a la Clase que se indica

En cuanto al **análisis cuantitativo**, la media de estas mieles se define en la clase III de Maurizio, resultado acorde con el tipo de miel, que es según Von der Ohe [2004] es el correspondiente a mieles monoflorales de pólenes suprarrepresentados y mieles de mielato.

➤ Miel de CASTAÑO

Se han estudiado 11 muestras monoflorales de castaño producidas en la comarca de la Sierra de San Vicente (Toledo) (tabla II.33.). En el **análisis cualitativo** de

estas mieles se han contabilizado 26 tipos polínicos con un porcentaje mayor del 1% de frecuencia relativa, pertenecientes a un total de 14 familias.

Abundancia relativa: el polen principal (P) es el de la flor del castaño (*Castanea sativa*). Es un polen de los considerados en Melisopalinología como suprarrepresentados. La abundancia media encontrada en estas mieles es del 78%, algo por debajo del mínimo recogido en los métodos armonizados de melisopalinología [Von der Ohe et al., 2004], que fue establecido en 86% (ver tabla I.2., capítulo I). En este trabajo se consideró la abundancia relativa mínima de *Castanea sativa* en 70% para delimitar la monofloralidad de castaño, porque en estas mieles de castaño es difícil llegar a porcentajes tan altos, de hecho solo una de las muestra supera el 86%.

No aparece polen secundario (S), debido principalmente a la alta suprarrepresentación del polen principal, como ocurría con las mieles de viborera.

Pólenes englobados como de importancia minoritaria (IM) sólo hay 2 tipos polínicos: *Echium*, que aparece en todas las mieles de castaño estudiadas; y tipo *Rubus*, que lo hace en el 92% de las muestras.

Hay una gran variedad de pólenes minoritarios (M), 23 en concreto. Los tipos polínicos que así aparecen en esta variedad de miel son: *Cistus ladanifer*, otras Leguminosas y *Lavandula stoechas*.

Frecuencia de aparición en las muestras: Los taxones que aparecen en un mayor número de muestras, además de castaño (*Castanea sativa*), son: *Echium*, *Rubus* t., *Cistus ladanifer*, “otras Leguminosae” y *Lavandula stoechas* que están presentes en más del 69% de las muestras. A la vista de estos resultados, hay que resaltar que estas mieles son las que presentan una menor diversidad botánica y un perfil palinológico más estable de entre todas las estudiadas.

Tabla II.33. Características palinológicas de la miel de castaño de la Sierra de San Vicente (Toledo).

FAMILIA O SUBFAMILIA	TIPOS POLÍNICOS	Abundancia relativa ¹		Frecuencia de aparición ³ , %
		Media, %	Carácter ²	
BORAGINACEAE	<i>Echium</i>	5	IM	100
	Otras Boraginaceae	2	M	8
CAMPANULACEAE	Campanulaceae	1	M	46
CAPRIFOLIACEAE	<i>Lonicera</i>	-	-	-
CICHORIOIDEAE	Cichorioideae	1	M	23
CISTACEAE	<i>Cistus ladanifer</i>	2	M	85
	<i>Helianthemum</i> t.	-	-	-
	Otros Cistaceae	-	-	-
CRUCIFERAE (BRASSICACEAE)	<i>Brassica</i> t.	1	M	46
ASTEROIDEAE	<i>Carduus</i> t.	-	-	-
	<i>Centaurea</i> t.	-	-	-
	<i>Helianthus</i>	-	-	-
	<i>Senecio</i> t.	-	-	-
	Otras Asteroideae	-	-	-
CONVOLVULACEAE	Convolvulus	-	-	-
CUPRESSACEAE	<i>Juniperus</i>	-	-	-
CHENOPODIACEAE	Chenopodiaceae	-	-	-
ERICACEAE	Ericaceae	2	M	23
EUPHORBIACEAE	Euphorbia	-	-	-
FAGACEAE	<i>Castanea sativa</i>	78	P	100
	<i>Quercus ilex</i> t.	1	M	54
	<i>Quercus suber</i> t.	2	M	23
	Otros <i>Quercus</i>	2	M	38
LABIATAE	<i>Lamium</i>	-	-	-
	<i>Lavandula latifolia</i>	-	-	-
	<i>Lavandula stoechas</i>	2	M	69
	<i>Mentha</i>	-	-	-
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	1	M	23
	<i>Salvia</i>	-	-	-
	<i>Satureja</i>	-	-	-
	<i>Thymus</i>	-	-	-
	<i>Teucrium</i>	-	-	-
	Otras Labiatae	-	-	-
LEGUMINOSAE	<i>Medicago</i>	0	M	38
	<i>Cytisus</i> t.	3	M	15
	<i>Lotus</i> t.	-	-	-
	<i>Retama</i> t.	2	M	8
	<i>Trifolium</i> t.	0	M	23
	<i>Vicia</i> t.	-	-	-
	Otras Leguminosae	3	M	77

Tabla II.33. (continuación)

FAMILIA O SUBFAMILIA	TIPOS POLÍNICOS	Abundancia relativa ¹		Frecuencia de aparición ³ , %
		Media, %	Carácter ²	
LILIACEAE	Liliaceae	-	-	-
MYRTACEAE	<i>Eucalyptus</i>	1	M	46
OLEACEAE	<i>Olea europea</i>	1	M	23
	Otras Oleaceae	-	-	-
OXALIDACEAE	<i>Oxalis</i>	-	-	-
PAPAVERACEAE	<i>Hypecoum</i>	-	-	-
	Otras Papaveraceae	-	-	-
PINACEAE	<i>Pinus</i> t.	-	-	-
PLANTAGINACEAE	<i>Plantago</i>	-	-	-
POACEAE	Poaceae	-	-	-
POLYGONACEAE	<i>Rumex</i>	-	-	-
RANUNCULACEAE	<i>Ranunculus</i>	-	-	-
RESEDACEAE	Resedaceae	-	-	-
RHAMNACEAE	Rhamnaceae	-	-	-
ROSACEAE	<i>Crataegus monogyna</i> t.	2	M	15
	<i>Prunus</i> t.	1	M	15
	<i>Rubus</i> t.	8	IM	92
	Otras Rosaceae	1	M	31
SALICACEAE	<i>Salix</i>	1	M	38
SCROPHULARIACEAE	Scrophulariaceae	-	-	-
UMBELLIFERAE	Umbelliferae	1	M	8

Análisis polínico CUANTITATIVO*: clase III de Maurizio

¹ Abundancia relativa de clases (%): valor medio del número de granos de polen encontrados de cada tipo polínico del total de taxones.

² Carácter o clase de dominancia: P = polen principal (>45%), S = polen secundario (16 % - 45%), IM = polen importante minoritario (3% - 15%), M= polen minoritario (1% - 3%).

³ Frecuencia de aparición (%): Porcentaje de la presencia del tipo polínico en las muestras.

* Las mieles de este tipo pertenecen mayoritariamente a la Clase que se indica

En cuanto al **análisis cuantitativo**, la media de estas mieles está en la clase III de Maurizio, lo esperado para esta variedad de miel según Von der Ohe et al. [2004] para las mieles europeas monoflorales de pólenes suprarrepresentados y mieles de mielato.

➤ MIELATO

Se han estudiado 5 muestras de miel de mielada de encina (o mielato) producidas en la provincia de Guadalajara (tabla II.34). En el **análisis cualitativo** de estos mielatos se han contabilizado 41 tipos polínicos de frecuencia relativa mayor del

1%, pertenecientes a un total de 22 familias, lo cual indica una amplia diversidad botánica en estas mieles de mielato.

Abundancia relativa: estas mieles son diferentes de las mieles de néctar a todos los niveles, químico, físico y biológico, de modo que el análisis palinológico también será algo diferente. A pesar de estas diferencias, en este apartado se evalúan simplemente los acompañantes polínicos que lleva un mielato de encina de Guadalajara.

Estas diferencias comienzan en que no hay un polen principal (P), pero si hay una gran cantidad de esporas y microalgas a diferencia de las mieles florales. Aparecen varios pólenes secundarios (S), en concreto 2: tipo *Rubus* con un 19% de abundancia relativa y “otras Leguminosae” con un 17%, con presencia de ambos en casi todas las muestras de mielatos.

Pólenes englobados como de importancia minoritaria (IM) hay 15 tipos polínicos, entre los que destaca *Echium*, “otras Cistaceae” y “otras Asteroideae”, que aparecen en todas los mielatos; *Brassica* t. y *Retama* t. no están presentes en todas las muestras pero tienen una amplia representación. Otros son *Helianthus*, *Crataegus* t. y “otras Rosaceae”.

En 24 tipos polínicos minoritarios (M) se recoge la amplia diversidad botánica de estos mielatos, cuya representación más homogénea y, de constante presencia en todas las muestras, es la de *Lavandula stoechas*, *Lotus* t., Umbelliferae y *Quercus ilex* t. Este último taxon es el principal responsable de que esta miel tenga mielada en mayor proporción que néctar.

Frecuencia de aparición en las muestras: Los taxones que aparecen en un mayor número de muestras son: *Echium*, “otras Cistaceae”, “otras Asteroideae”, *Lavandula stoechas*, *Brassica* t., *Helianthus* y *Quercus ilex* t. que aparecen en todas las muestras; y “otras Leguminosae” *Lotus* t. y *Rubus* t. que están en la mayoría de ellas. En cuanto al **análisis cuantitativo**, la media de estas mieles está en la clase III de Maurizio, lo esperado para lo mielatos según Von der Ohe et al. [2004] para mieles europeas monoflorales de pólenes suprarrepresentados y mieles de mielato.

Tabla II.34. Características palinológicas del mielato de encina de Guadalajara

FAMILIA O SUBFAMILIA	TIPOS POLÍNICOS	Abundancia relativa ¹		Frecuencia de aparición ³ , %
		Media, %	Carácter ²	
BORAGINACEAE	<i>Echium</i> spp.	5	IM	100
	Otras boraginaceae	2	M	67
CAMPANULACEAE	<i>Campanula</i>	-	-	-
CAPRIFOLIACEAE	<i>Lonicera</i>	-	-	-
CICHORIOIDEAE	Cichorioideae	1	M	67
CISTACEAE	<i>Cistus ladanifer</i>	1	M	67
	<i>Helianthemum</i> t.	-	-	-
	Otras Cistaceae	5	IM	100
CRUCIFERAE (BRASSICACEAE)	<i>Brassica</i> t.	5	IM	83
ASTEROIDEAE	<i>Carduus</i> t.	-	-	-
	<i>Centaurea</i> t.	-	-	-
	<i>Helianthus</i>	4	IM	83
	<i>Senecio</i> t.	-	-	-
	Otras Asteroideae	6	IM	100
CONVOLVULACEAE	<i>Colvolvulus</i>	-	-	-
CUPRESSACEAE	<i>Juniperus</i>	4	IM	33
CHENOPODIACEAE	Chenopodiaceae	2	M	17
ERICACEAE	Ericaceae	15	IM	5
EUPHORBIACEAE	<i>Euphorbia</i>	-	-	-
FAGACEAE	<i>Castanea sativa</i>	-	-	-
	<i>Quercus ilex</i> t.	2	M	100
	<i>Quercus suber</i> t.	-	-	-
	Otros <i>Quercus</i>	2	M	33
	<i>Lamium</i>	-	-	-
LABIATAE	<i>Lavandula latifolia</i>	-	-	-
	<i>Lavandula stoechas</i>	1	M	100
	<i>Mentha</i>	1	M	17
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	2	M	50
	<i>Salvia</i>	-	-	-
	<i>Satureja</i>	-	-	-
	<i>Thymus</i>	4	IM	50
	<i>Teucrium</i>	-	-	-
	Otras Labiatae	1	M	1
	<i>Medicago</i>	2	M	17
LEGUMINOSAE	<i>Cytisus</i> t.	2	M	33
	<i>Lotus</i> t.	2	M	83
	<i>Retama</i> t.	4	IM	67
	<i>Trifolium</i> t.	8	IM	50
	<i>Vicia</i> t.	2	M	17
	Otras Leguminosae	17	S	83

Tabla II.34. (continuación)

FAMILIA O SUBFAMILIA	TIPOS POLÍNICOS	Abundancia relativa ¹		Frecuencia de aparición ³ , %
		Media, %	Carácter ²	
LILIACEAE	Liliaceae	3	M	67
MYRTACEAE	<i>Eucalyptus</i>	3	M	17
OLEACEAE	<i>Olea europea</i>	5	IM	17
	Oleaceae	1	M	33
OXALIDACEAE	<i>Oxalis</i>	1	M	17
PAPAVERACEAE	<i>Hypecoum</i>	1	M	33
	Otras Papaveraceae	1	M	33
PINACEAE	<i>Pinus</i> t.	-		-
PLANTAGINACEAE	<i>Plantago</i>	2	M	17
GRAMINEAE (POACEAE)	Poaceae	1	M	50
POLYGONACEAE	<i>Rumex</i>	-		-
RANUNCULACEAE	<i>Ranunculus</i>	-		-
RESEDACEAE	Resedaceae	-		-
RHAMNACEAE	Rhamnaceae	-		-
ROSACEAE	<i>Crataegus monogyna</i> t.	6	IM	67
	<i>Prunus</i> t.	4	IM	50
	<i>Rubus</i> t.	19	S	83
	Otras Rosaceae	9	IM	67
SALICACEAE	<i>Salix</i>	4	IM	50
SCROPHULARIACEAE	Scrophulariaceae	2	M	33
UMBELLIFERAE	Umbelliferae	3	M	100

Análisis polínico CUANTITATIVO*: clase II de Maurizio

¹ Abundancia relativa de clases (%): valor medio del número de granos de polen encontrados de cada tipo polínico del total de taxones.

² Carácter o clase de dominancia: P = polen principal (>45%), S = polen secundario (16 % - 45%), IM = polen importante minoritario (3% - 15%), M= polen minoritario (1% - 3%).

³ Frecuencia de aparición (%): Porcentaje de la presencia del tipo polínico en las muestras.

* Las mieles de este tipo pertenecen mayoritariamente a la Clase que se indica

4.6. Perfiles sensoriales de las mieles monoflorales de Castilla La Mancha

El análisis sensorial consiste en la evaluación de las características de un producto a través de los órganos de los sentidos.

Las directrices básicas para realizar el análisis sensorial de una miel vienen recogidas en la Directiva europea *relativa a la miel* [DOUE L 10/47 de 12 de enero de 2002]: “El color de la miel puede tener desde un tono casi incoloro a un tono pardo oscuro. Puede tener una consistencia fluida, espesa o cristalizada (en parte o en su totalidad). El sabor y el aroma pueden variar, pero se derivan del **origen vegetal**. No debe tener un gusto o un olor extraños ni haber comenzado a fermentar, presentar un

grado de acidez modificado artificialmente, ni haberse calentado de manera que las enzimas naturales se destruyan o resulten poco activas”.

A continuación se detallan los resultados pormenorizados del análisis sensorial de las mieles monoflorales producidas en Castilla-La Mancha:

➤ Miel de **ROMERO**

Fase visual: Son mieles que en forma líquida tienen una coloración de **ámbar extra claro a blanco** y, con una tonalidad entre blanca (intensidad moderada), ocre (intensidad débil-media) y amarilla (intensidad débil) cuando están cristalizadas, figura II.29.A.

Fase olfativa: Al analizar las características olfativas de estas mieles observamos que de manera general, tienen una intensidad y persistencia de aroma débil. Siguiendo la valoración publicada por la IHC, basada en la rueda de aromas, se observa que su cualidad más destacada es la **floral** con una intensidad entre leve y moderada; menos frecuentemente le siguen las características: afrutada (intensidad moderada mayoritariamente), animal transpiración y cálido sutil de intensidad débil. En cada caso, las plantas que le aportan éstas cualidades secundarias son: frutales (afrutada), tomillo (transpiración), ciertas leguminosas o crucíferas (cálido sutil), figura II.29.B.

Fase gustativa: Resulta una miel con un marcado carácter **dulce** (de moderado a fuerte) y **ácido** (entre débil y moderado). Las sensaciones gustativas primordiales son **floral** y **fresca** (intensidad media en ambas), con ciertas connotaciones picantes (intensidad débil) que se presume debidas a la presencia de néctar de tomillo, ya que el periodo de floración de esta planta es coincidente en el tiempo con el romero. En cuanto al retrogusto no hay ninguna sensación destacable, figura II.29.C.

Textura: de forma natural esta miel es líquida, pastosa o cristalizada, en función del tiempo transcurrido entre su extracción y la fecha de análisis o consumo. La miel de romero cristaliza a partir de los seis meses con una cristalización fina.

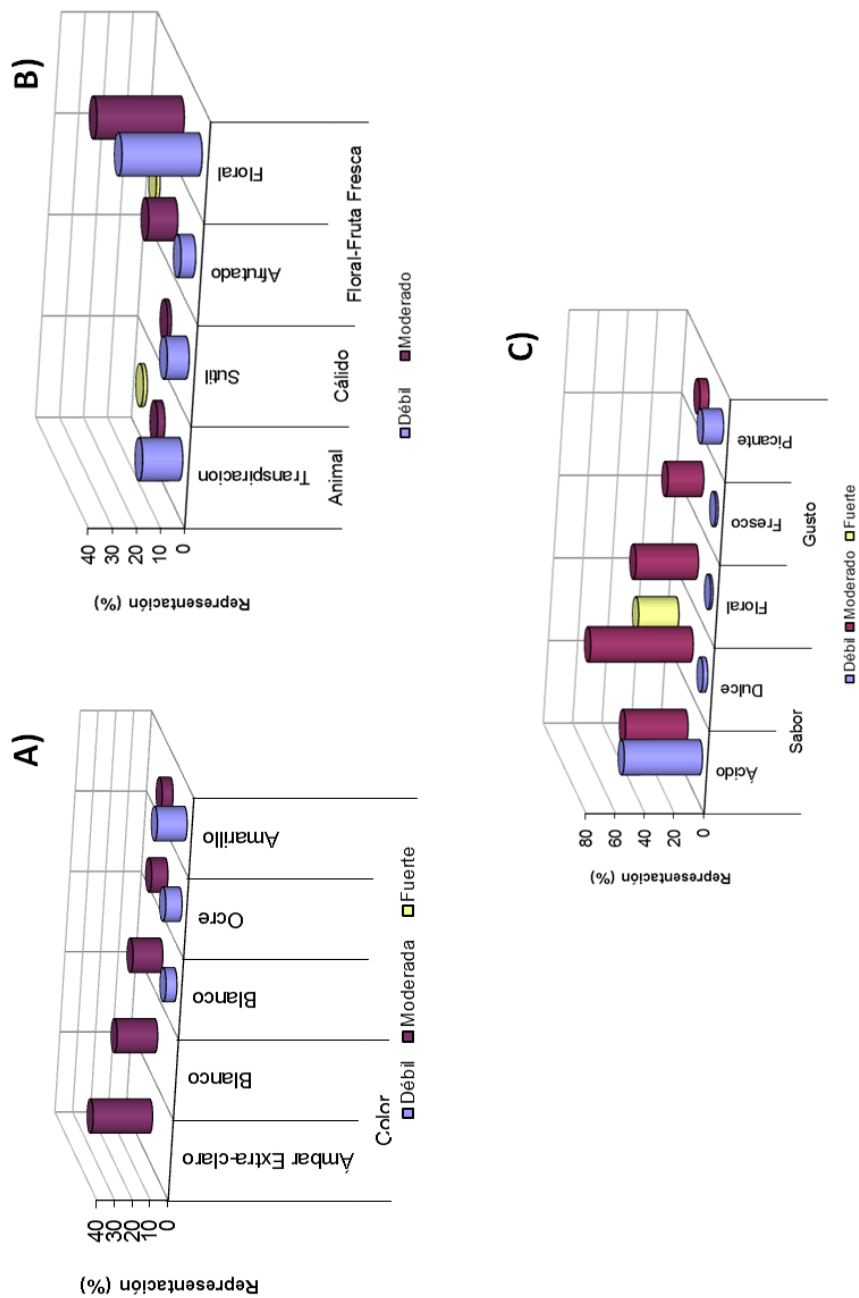


Figura II.29. Características sensoriales de las mieles de romero A) fase visual, B) fase olfativa, C) fase gustativa

➤ Miel de **ESPLIEGO**

Fase visual: Son mieles cuya definición visual en estado líquido es **ámbar claro**, básicamente. Cuando la miel cristaliza toma ciertas connotaciones: ocre, amarillo, naranja o marrón, siendo las tonalidades ocre y amarillo las que se dan con mayor frecuencia (suponiendo en torno al 70% de las tonalidades presentes) con una intensidad entre débil y moderada, figura II.30.A.

Fase olfativa: Al analizar las características olfativas de estas mieles observamos que de manera general, tienen una intensidad y persistencia de aroma entre medio a intenso. Su definición olfativa es fundamentalmente **aromática balsámica** (detectado en un 90% de las muestras) de una intensidad moderada. El resto de atributos resultan sensaciones acompañantes, que mayoritariamente son florales y cálido sutil, con una intensidad moderada, figura II.30.B.

Las demás sensaciones suelen ser cualidades secundarias aportadas por el néctar de las plantas acompañantes. Estas sensaciones están englobadas en cálido ahumadas y/o sutiles, desde floral a afrutado y vegetal fresco. Estas sensaciones provienen de la presencia más o menos importante de néctar de frutales, mieladas, ajedrea (cálido ahumado) y girasol, acompañantes muy habituales de este tipo de miel.

Fase gustativa: resulta una miel con un marcado carácter **dulce** y acidez de intensidad variable, con un amplio abanico de sensaciones gustativas. Destaca un sabor **balsámico** de intensidad moderada a fuerte en casi el 90% de las muestras y connotaciones secundarias como son el afrutado, aromático y floral. Presenta un retrogusto fundamentalmente fresco y con menor intensidad astringente, figura II.30.C.

Textura: En fresco presenta una textura líquida densa. Al pasar unos meses a temperatura ambiente comienza una cristalización pastosa (granulación fina).

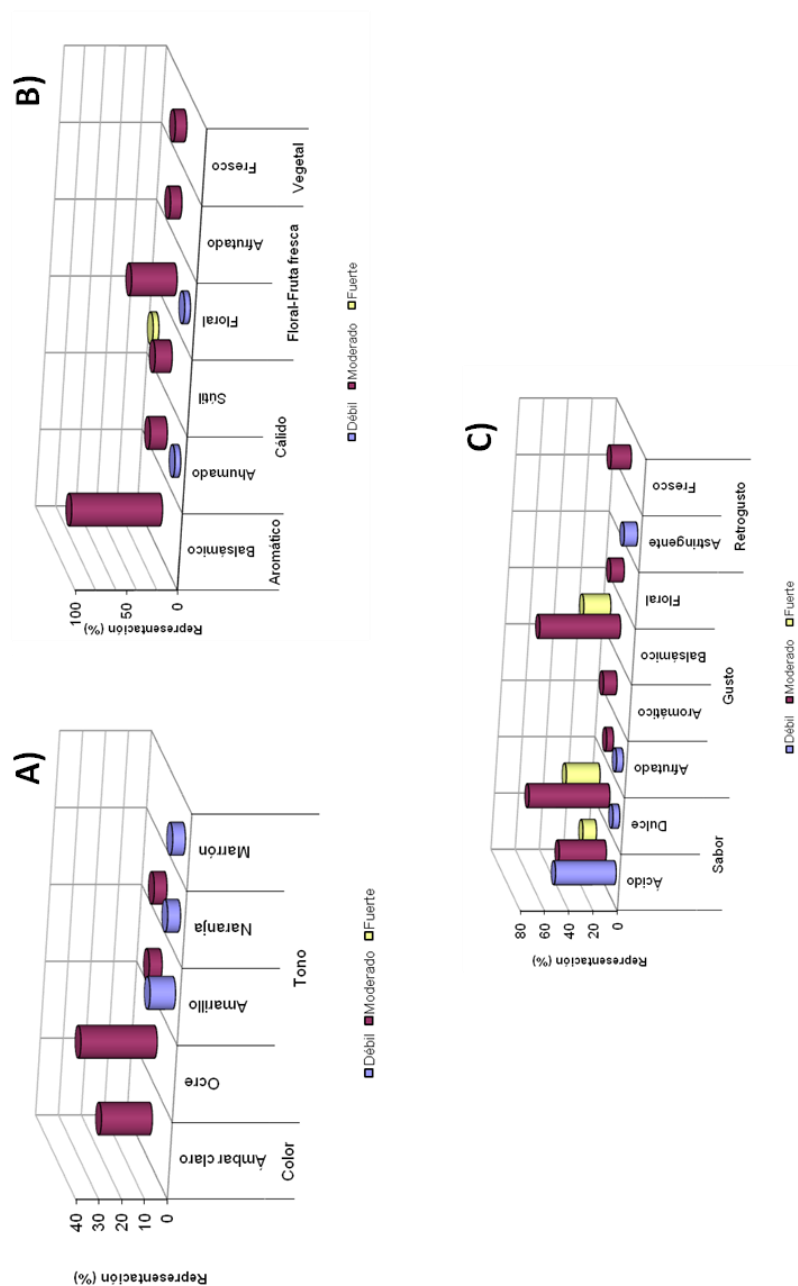


Figura II.30. Características sensoriales de las mieles de espliego A) fase visual, B) fase olfativa, C) fase gustativa

➤ Miel de **TOMILLO**

Fase visual: en estado líquido estas mieles presentan fundamentalmente color **ámbar claro**, definido así en un 84% de las muestras. El resto se definen como ámbar extra claro. Aunque no se representa en el gráfico, es de destacar una cualidad muy característica de la miel de tomillo que son las **connotaciones rojizas**, cuando la miel es líquida. Cuando cristaliza toma tonalidades de amarillentas a anaranjadas hasta rojizas, figura II.31.A.

Fase olfativa: Al analizar las características olfativas de estas mieles observamos que de manera general, tienen una intensidad y persistencia de aroma fuerte. Destaca entre las características aromáticas el atributo **transpiración** con una intensidad de moderada a fuerte. Este carácter, algo desagradable, ayuda a identificar sensorialmente la miel de tomillo de la Alcarria. Otros atributos olfativos que aparecen con cierta frecuencia son: afrutado, floral, establo y cálido sutil, figura II.31.B.

Fase gustativa: Al analizar el sabor de estas mieles observamos que la característica principal es el dulzor moderado y un ligero toque ácido. Al describir las sensaciones gustativas el atributo más relevante es el afrutado, seguido del balsámico, aromático, floral y vegetal, variables según los acompañantes botánicos del néctar de tomillo. En cuanto al retrogusto que dejan estas mieles, es muy típico un **picor** en la garganta, que ayudará a identificar sensorialmente estas mieles. Además un retrogusto rancio es muy típico de estas mieles de tomillo, figura II.31.C.

Textura: de forma natural es líquida, pastosa o cristalizada, en función del tiempo transcurrido entre su extracción y la fecha de análisis o consumo. La miel de tomillo cristaliza alrededor de los seis meses en forma de cristales de tamaño medio a grande.

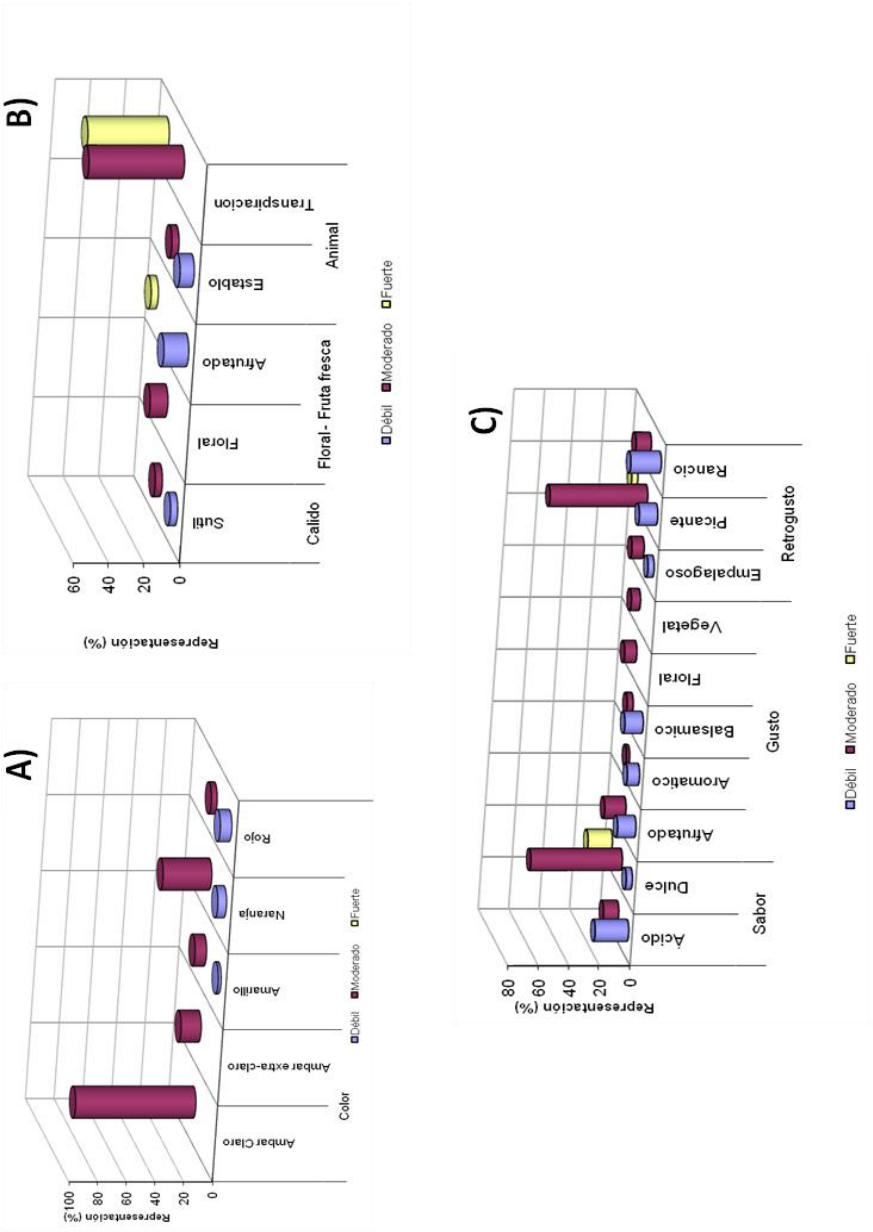


Figura II.31. Características sensoriales de las mieles de tomillo A) fase visual, B) fase olfativa, C) fase gustativa

➤ Miel de **VIBORERA**

Fase visual: el color de estas mieles ha sido encasillado entre **ámbar claro** y **ámbar**. Las mieles que contenían néctar de castaño eran bastante más oscuras que las que no tenían nada de castaño. El tono es predominantemente **marrón** con todo tipo de intensidades, también yema, naranja, rojo y negro, figura II.32.A.

Fase olfativa: Al analizar las características olfativas de estas mieles observamos que de manera general, tienen una intensidad y persistencia de aroma débil. Destacan en este tipo de miel los **atributos vegetales** como son el verde y antagónicamente también el seco, de intensidad entre débil y moderada. También se presentan toques florales y con menos frecuencia ácidos, figura II.32.B.

Fase gustativa: El sabor de estas mieles tiene dulzor entre débil y moderado limitado por un característico y destacado **amargor** en casi el 70% de las mieles catadas y con un toque ácido entre débil y moderado. Los atributos gustativos más representados son madera, fruta desecada y floral. Parece que el néctar de esta planta no imprime unas características organolépticas fuertes, por lo que la presencia de otros néctares con mayor fuerza sensorial podría tapar las características propias de esta miel, como es el toque madera que aparece en el 35% de estas mieles característico de las mieles de castaño. Lo mismo ocurre con el retrogusto, se observa una gran variabilidad de atributos: de astringente a tostado, pasando por caramelo, empalagoso, fresco, picante o seco, figura II.32.C.

Textura: cuando es fresca es fundamentalmente líquida y algo **untuosa**. Tiene rápida tendencia a la cristalización en pocos meses, formando **cristales gruesos**.

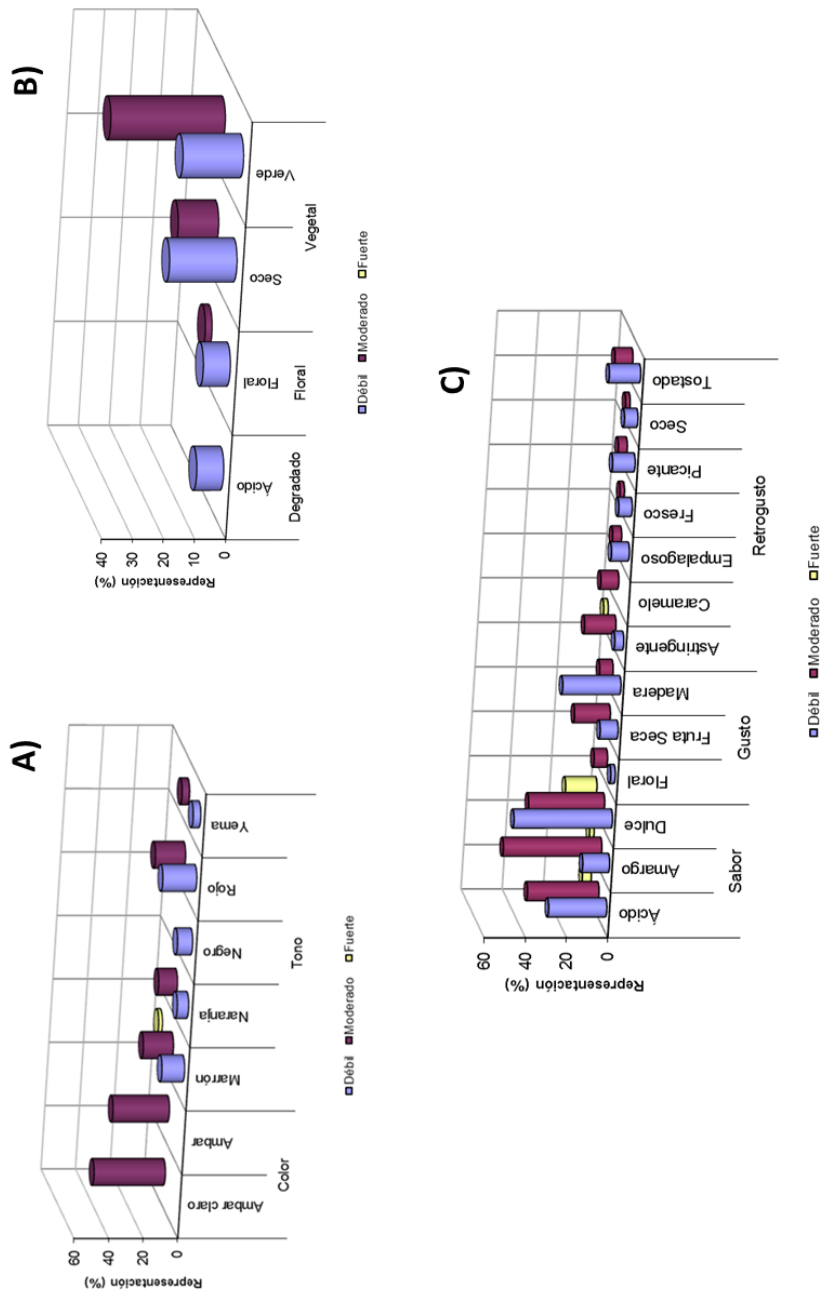


Figura II.32. Características sensoriales de las mieles de viborera A) fase visual, B) fase olfativa, C) fase gustativa

➤ Miel de **CASTAÑO**

Fase visual: Son mieles que en estado líquido tienen una definición visual de **ámbar** a **ámbar oscuro** y que, cuando cristalizan, adquieren una tonalidad marrón (intensidad fuerte en más del 50% de las muestras analizadas) y, de manera más esporádica, rojo. Es muy característico de estas mieles un **brillo** como si fuera un **espejo** al mirar la superficie del contenido, figura II.33.A.

Fase olfativa: Al analizar las características olfativas de estas mieles observamos que de manera general, tienen una intensidad y persistencia de aroma medio. Siguiendo la valoración publicada por la IHC, basada en la rueda de aromas, se observa que su cualidad más característica es **aromático madera** (intensidad media, principalmente) y menos frecuentemente toques de cálido tostado y floral sutil, figura II.33.B.

Fase gustativa: Resulta una miel con un sabor de marcado carácter **amargo**, a la vez que un dulce algo menos intenso y en alguna ocasión con toque salado. La sensación gustativa primordial es a **madera** y en alguna ocasión a almendra amarga. El retrogusto, fundamentalmente **astringente** y menos frecuentemente picante y tostado, figura II.33.C.

Textura: La textura que presentan estas mieles de forma natural es líquida y pastosa. La miel de castaño tarda mucho tiempo en cristalizar, al menos 1 año.

➤ **MIELATO**

Fase visual: Los colores que presentan los mielatos de encina de la provincia de Guadalajara están entre el **ámbar** y el **ámbar oscuro** en fase líquida y con tonalidades rojizas al cristalizar. Una característica especial, que también presentaban las mieles de castaño, es la de presentar un **brillo espejo**.

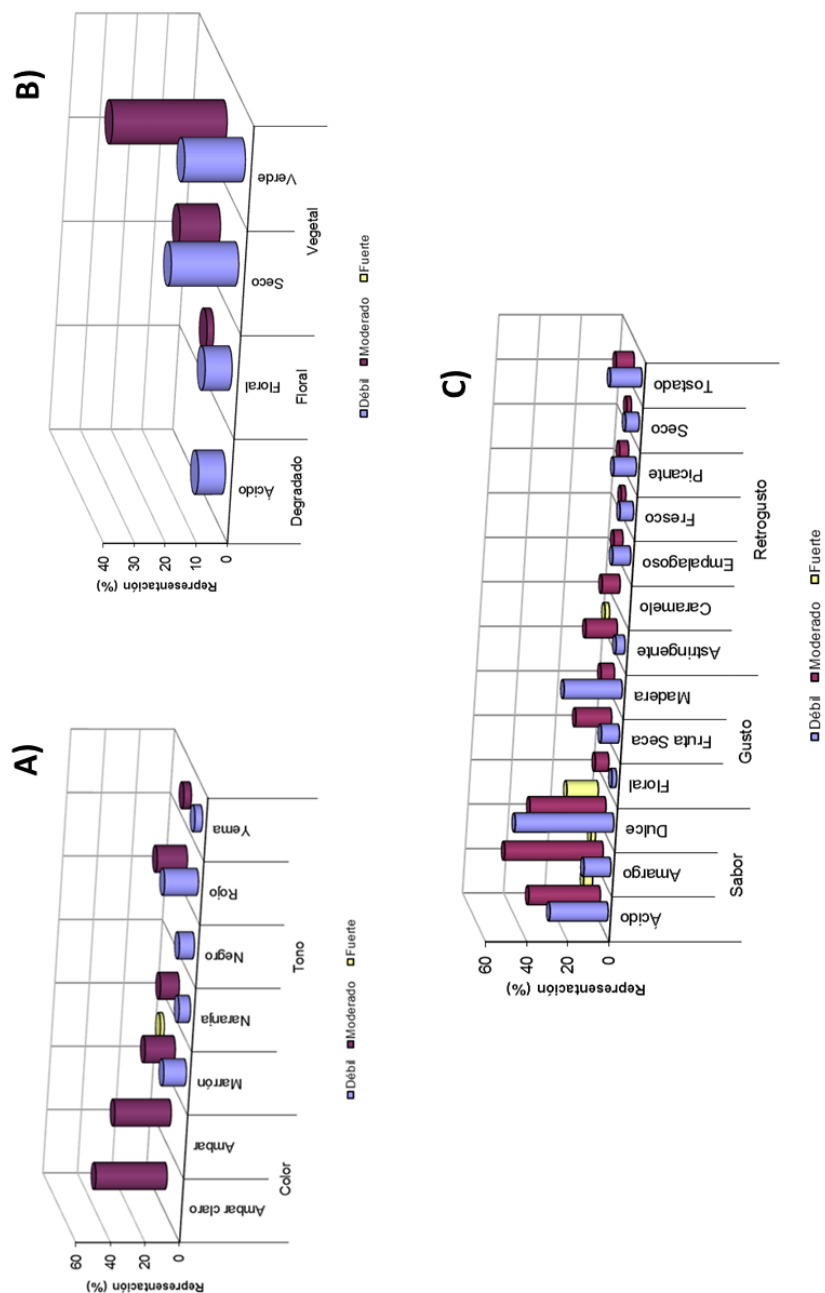


Figura II.33. Características sensoriales de las mieles de castaño A) fase visual, B) fase olfativa, C) fase gustativa

Fase olfativa: Al analizar las características olfativas de estos mielatos, a grosso modo, observamos que tienen una intensidad y persistencia de aroma débil. Esta sensación es descrita como **cálido sutil** de intensidad débil a moderada. También es característico un **aromático madera** de intensidad entre débil y moderado, y menos frecuentemente un floral pesado moderado.

Fase gustativa: el principal carácter gustativo de estos mielatos es su **amargor**, con una intensidad de moderada a fuerte, que enmascara en parte, el sabor dulce, cuya percepción se queda en intensidad débil. Al describir el sabor destaca la **fruta desecada** y la **madera**. Al analizar el retrogusto se dan todos los niveles de **astringencia** y con intensidad moderada, sequedad.

Textura: tras la extracción de la colmena, el estado en el que están los mielatos es líquido, pero muy **viscoso** y **pegajoso**. La cristalización es muy lenta a temperatura ambiente, pudiendo pasar años hasta que se produzca este fenómeno.

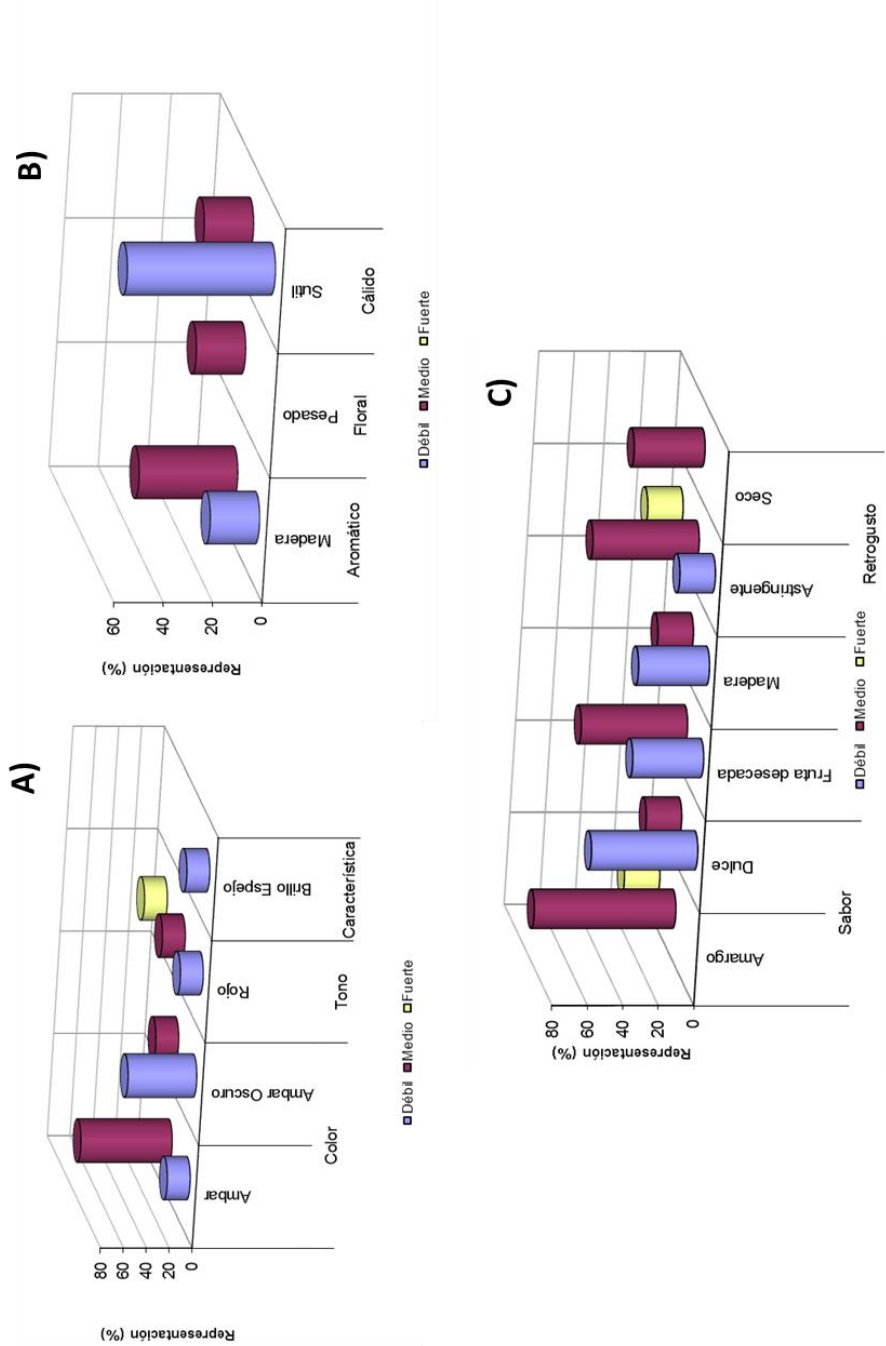


Figura II.33. Características sensoriales de las mieles de mielato A) fase visual, B) fase olfativa, C) fase gustativa

5. CONCLUSIONES Y FICHAS RESUMEN

1. Se han caracterizado las mieles monoflorales de romero y espliego de la comarca de la Alcarria, además de la miel de tomillo que no es parte de la D.O.P. “Miel de la Alcarria”. Así mismo, se han tipificado por primera vez, los mielatos de encina de Guadalajara, la miel de castaño producida en la comarca de la Sierra de San Vicente (Toledo) y la miel de viborera producida en las provincias de Ciudad Real y Toledo. El resumen de los resultados de la caracterización de varias mieles monoflorales de Castilla-La Mancha se ha realizado de forma esquematizada mediante fichas que recogen la principal información de cada tipo de miel:
 - Lugar de producción
 - Periodo de cosecha de la miel
 - Sus características organolépticas: visuales, aromáticas, gustativas y de textura
 - Las características palinológicas, que definen el tipo de miel y el entorno paisajístico donde se producen estas mieles. Solo se detallan: el polen dominante (foto), se refleja entre paréntesis el dato del porcentaje mínimo necesario para considerar monofloralidad; los pólenes secundarios y los pólenes minoritarios importantes. Lo que no reflejamos son los pólenes minoritarios, que pueden ser muy numerosos.
 - Las características físico-químicas principales: HMF, humedad, pH, acidez libre, conductividad eléctrica, color Pfund y CIELAB.
 - Y, por último, se añaden observaciones o peculiaridades que tenga el tipo de miel en cuestión.
2. Se han clasificado correctamente alrededor del 76% de las 64 muestra de miel de acuerdo con su origen botánico, a partir de los parámetros fisicoquímicos y de color CIELAB.

MIEL de ROMERO



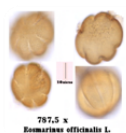
PRODUCCIÓN:

- **Zona de producción:** comarca de la Alcarria (Guadalajara y Cuenca).
- **Periodo de cosecha:** primavera (mayo y junio).



CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS:

- **Color:** De ámbar extra claro a blanco en estado líquido. Blanquecino con tonos ocres o amarillos cuando cristaliza.
- **Aroma:** Intensidad y persistencia débiles. Sensaciones florales, afrutadas, transpiración y cálido sutil.
- **Sabor:** Muy dulce con un toque ácido, suave y poco persistente. Sensaciones florales y frescas.
- **Textura:** Líquida fluida tras la extracción. Cuando empieza a cristalizar su consistencia es pastosa, de grano fino y color blanco.



CARACTERÍSTICAS PALINOLÓGICAS:

- **Polen dominante ($\geq 15\%$):** *Rosmarinus officinalis*.
- **Polen secundario (16-44%):** *Hypocoum*, Leguminosas, otros *Quercus*.
- **Pólenes minoritarios importantes (3-15%):** *Thymus*, *Quercus ilex* t., *Brassica* t., *Crataegus monogyna*.



CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS y de FRESCURA:

- **Humedad** = $(16.0 \pm 0.70)\%$
- **pH** = 4.0 ± 0.1
- **Acidez libre** = (12 ± 5) meq/Kg
- **Conductividad eléctrica** = (0.14 ± 0.03) mS/cm
- **COLOR Pfund** = (19 ± 6) mm
- **COLOR CIELAB:** $L^*_{10} = 84.04$; $a^*_{10} = 0.37$; $b^*_{10} = 22.17$; $C^*_{ab} = 22.19$; $hab_{ab,10} = 89.32^\circ$
- **HMF** = (2 ± 2) mg/Kg

OBSERVACIONES:

- Miel muy apreciada por los consumidores por su sabor suave y sus connotaciones frescas y florales.

MIEL de ESPLIEGO



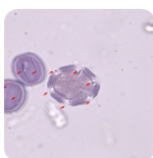
PRODUCCIÓN:

- **Zona de producción:** comarca de la Alcarria (Guadalajara y Cuenca).
- **Periodo de cosecha:** verano (julio, agosto y septiembre).



CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS:

- **Color:** Ambar claro en estado líquido. Amarillo-ocre cuando cristaliza.
- **Olor:** De intensidad y persistencia media a fuerte. Atributo aromático más característico: balsámico.
- **Sabor:** Sabor moderadamente dulce y ácido con refrescante y persistente toque balsámico. Retrogusto intenso y afrutado característico.
- **Textura:** Suele ser una miel densa con tendencia a una cristalización muy fina.



CARACTERÍSTICAS PALINOLÓGICAS:

- **Polen dominante ($\geq 10\%$):** *Lavandula latifolia*.
- **Polen secundario (16-44 %):** -
- **Pólenes minoritarios importantes (3-15%):** *Rubus* t. y otras Rosáceas, *Lotus* t. y otras Leguminosas, *Quercus ilex* t.



CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS y de FRESCURA:

- **Humedad** = $(16 \pm 1)\%$
- **pH** = 4.0 ± 0.3
- **Acidez libre** = (19 ± 6) meq/Kg
- **Conductividad eléctrica** = (0.24 ± 0.07) mS/cm
- **COLOR Pfund** = (41 ± 13) mm
- **COLOR CIELAB:** $L^*_{10} = 80.53$; $a^*_{10} = 2.35$; $b^*_{10} = 53.20$; $C^*_{ab} = 53.31$; $hab_{ab,10} = 88.00^\circ$
- **HMF** = (3 ± 3) mg/Kg

OBSERVACIONES:

- Miel muy apreciada por los consumidores por su sabor y olor balsámicos característicos.

MIEL de TOMILLO



PRODUCCIÓN:

- **Zona de producción:** comarca de la Alcarria (Guadalajara y Cuenca).
- **Periodo de cosecha:** primavera (mayo y junio).



CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS:

- **Color:** Ámbar claro con tonalidad rojizo. Cristalizada presenta un color anaranjado.
- **Olor:** Olor a rancio intenso (transpiración) y persistente.
- **Sabor:** Dulce moderado y ligero toque ácido. Retrogusto picante.
- **Textura:** Líquida densa. Lenta tendencia a la cristalización en forma de cristales de tamaño medio-grande.



CARACTERÍSTICAS PALINOLÓGICAS:

- **Polen dominante (>15%):** *Thymus*.
- **Polen secundario (16-44%):** Leguminosas.
- **Pólenes minoritarios importantes (3-15%):** *Hypecoum*, *Quercus ilex* t., *Brassicaceas*, *Cistaceas*, *Rosmarinus officinalis*, *Crataegus monogyna*.



CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS y de FRESCURA:

- **Humedad** = $(16.3 \pm 0.7)\%$
- **pH** = 4.5 ± 0.2
- **Acidez libre** = (21 ± 3) meq/Kg
- **Conductividad eléctrica** = (0.3 ± 0.1) mS/cm
- **COLOR Pfund** = (47 ± 7) mm
- **COLOR CIELAB:** $L^*_{ab} = 72.67$; $a^*_{10} = 5.68$; $b^*_{10} = 53.42$; $C^*_{ab} = 53.81$; $hab_{ab,10} = 84.58^\circ$
- **HMF** = (3 ± 2) mg/Kg

OBSERVACIONES:

- Miel poco valorada organolépticamente por su fuerte sabor y olor a rancio característico. Destacable por ser una, prácticamente desconocida, fuente de vitamina C.

MIEL de VIBORERA



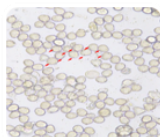
PRODUCCIÓN:

- **Zona de producción:** Toledo y Ciudad Real.
- **Periodo de cosecha:** primavera (mayo y junio).



CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS:

- **Color:** Ambar claro-ambar en forma líquida. Cristalizada adquiere un color marrón-amarillento.
- **Olor:** Aroma vegetal entre verde y seco.
- **Sabor:** Amarga y poco dulce.
- **Textura:** Consistencia pastosa. Fácil tendencia a cristalizar con una granulación gruesa.



CARACTERÍSTICAS PALINOLÓGICAS:

- **Polen dominante (>45%):** *Echiochloa* (polen suprarrepresentado que no da lugar a la existencia de un polen secundario).
- **Pólenes minoritarios importantes (3-16%):** Leguminosas y Crucíferas.
- **Pólenes minoritarios (>3%):** Cistáceas, *Lavandula stoechas* L., *Quercus* sp, *Rubus* t.



CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS y de FRESCURA:

- **Humedad** = $(16 \pm 1)\%$
- **pH** = 4.2 ± 0.3
- **Acidez libre** = (13 ± 10) meq/Kg.
- **Conductividad eléctrica** = (0.5 ± 0.3) mS/cm
- **COLOR Pfund** = (67 ± 23) mm
- **COLOR CIELAB:** $L^*_{10} = 59.25$; $a^*_{10} = 13.30$; $b^*_{10} = 58.23$; $C^*_{ab} = 57.66$; $hab_{ab,10} = 77.87^\circ$
- **HMF** = (6 ± 4) mg/Kg

OBSERVACIONES:

- En general son mieles de aroma y sabor muy débil, por lo que cualquier acompañante botánico influenciará sus características organolépticas.

MIEL de CASTAÑO



PRODUCCIÓN:

- **Zona de producción:** comarca de la Sierra de San Vicente (Toledo).
- **Periodo de cosecha:** verano (de julio a septiembre).



CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS:

- **Color:** en forma líquida es ámbar-ámbar oscuro con brillo espejo. Cristalizada toma un color marrón oscuro.
- **Aroma:** a madera con connotaciones cálido tostado y floral sutil.
- **Sabor:** amargo, poco dulce y ligero toque salado. Con sensación gustativa a madera. Retrogusto astringente.
- **Textura:** densa, gomosa y pegajosa. Cristaliza muy lentamente o no cristaliza.



CARACTERÍSTICAS PALINOLÓGICAS:

- **Polen dominante (>70%):** *Castanea sativa* (polen suprarrepresentado que no da lugar a la existencia de un polen secundario).
- **Pólenes minoritarios importantes (3-6%):** *Rubus* t. y *Echium*.
- **Pólenes minoritarios (1-3%):** Leguminosas, *Cistus ladanifer* y *Lavandula stoechas*. L.



CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS y de FRESCURA:

- **Humedad** = $(14.8 \pm 0.9)\%$
- **pH** = 5.0 ± 0.3
- **Acidez libre** = (42 ± 14) meq/Kg
- **Conductividad eléctrica** = (1.2 ± 0.2) mS/cm
- **COLOR Pfund** = (99 ± 14) mm
- **COLOR CIELAB:** $L^*_{10} = 40.39$; $a^*_{10} = 25.81$; $b^*_{10} = 67.62$; $C^*_{ab} = 67.54$; $hab_{ab,10} = 67.57^\circ$
- **HMF** = (2 ± 2) mg/Kg

OBSERVACIONES:

- Miel con destacables propiedades antibacterianas (9.53 % (p/v) fenol equivalente frente a *Staphylococcus aureus*) y antioxidantes. Muy apreciada por los consumidores por sus peculiaridades sensoriales.

MIELATO DE ENCINA



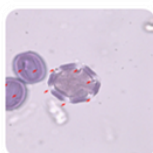
PRODUCCIÓN:

- **Zona de producción:** Provincia de Guadalajara.
- **Periodo de cosecha:** Septiembre - Octubre.



CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS:

- **Color:** en estado líquido es ámbar-ámbar oscuro con brillo espejo. Cristalizada adquiere una coloración marrón oscuro con tonalidades rojizas.
- **Olor:** Calido poco intenso, un toque aromático madera y floral pesado.
- **Sabor:** Amargor medio-fuerte y poco dulce. Sensaciones gustativas a fruta desecada y madera.
- **Textura:** Consistencia líquida muy densa y pegajosa. Cristaliza muy lentamente o no cristaliza.



CARACTERÍSTICAS PALINOLÓGICAS:

- **Presencia de esporas y microalgas**
- **Polen secundario (16-44%):** *Rubus* t. y Leguminosas.
- **Pólenes minoritarios importantes (4-15%):** *Echium*, Cistaceas y Asteroideas.
- **Pólenes minoritarios (1-3%):** Umbelíferas, *Quercus ilex* t., *Lavandula stoechas*.



CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS y de FRESCURA:

- **Humedad** = $(15.1 \pm 0.4)\%$
- **pH** = 4.8 ± 0.3
- **Acidez libre** = (30.2 ± 0.6) meq/Kg
- **Conductividad eléctrica** = (0.8 ± 0.3) mS/cm
- **COLOR Pfund** = (93 ± 17) mm
- **COLOR CIElab:** $L^*_{10} = 59.06$; $a^*_{10} = 20.93$; $b^*_{10} = 76.83$; $C^*_{ab} = 74.32$; $hab_{ab,10} = 74.21^\circ$
- **HMF** = (4 ± 5) mg/Kg

OBSERVACIONES:

- Miel de producción variable dependiendo del año climatológico.

CAPÍTULO III:

Vitamina C y azúcares como marcadores simples para la discriminación de mieles

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

La miel es un producto natural complejo apenas manufacturado, que contiene en sí mismo un gran número de nutrientes, principalmente azúcares, pero también otros componentes minoritarios como polifenoles, enzimas, minerales, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos, etc., que hacen que este alimento sea muy interesante desde un punto de vista nutricional y funcional. En el caso de las vitaminas, como fue mencionado en el capítulo I, las más habituales son las de carácter hidrosoluble, debido a la naturaleza hidrofílica de este producto. Y las que más se han descrito en la bibliografía especializada han sido la tiamina (vitamina B₁), la riboflavina (vitamina B₂), la niacina (vitamina B₃), el ácido pantoténico (vitamina B₅), la piridoxina (vitamina B₆), el ácido fólico (vitamina B₉) y el ácido ascórbico (vitamina C), aunque, en general, la cantidad es pequeña [Álvarez-Suárez et al., 2010b; Arvanitoyannis et al., 2005; Bogdanov et al., 2008]. La vitamina que aparece con más frecuencia es la vitamina C, con valores muy variables dependiendo del origen botánico de la miel [Ortiz Valbuena, 1992; White & Rudyj, 1978].

De acuerdo al Reglamento (CE) Nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, *relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los*

alimentos [DOUE L 404/9 de 30 de diciembre de 2006], es importante para el consumidor conocer el aporte de vitaminas a la dieta de este producto natural. En este reglamento se expone que solamente podrá declararse que un alimento es una fuente de vitaminas, si el producto contiene como mínimo una cantidad significativa¹ de ellas, tal y como viene definido en el anexo de la Directiva 2008/100/CE [DOUE L 285/9 de 29 de octubre de 2008].

A principios del siglo pasado se empezó a estudiar el contenido vitamínico en mieles, pero no fue hasta 1935 y gracias al empleo de bioensayos, cuando se detectó por primera vez la presencia de vitaminas. La primera vitamina detectada fue la vitamina B₂ o riboflavina [Markuze, 1935]. Los intentos anteriores por detectar todo tipo de vitaminas en mieles, tanto hidro como liposolubles, fueron inútiles, principalmente por los métodos de análisis empleados, que no llegaban a detectar las bajas concentraciones contenidas en mieles [Dutcher, 1918; Hoyle, 1929].

Posteriormente, Griebel y Hess [1939] realizaron un estudio del contenido de vitamina C en mieles de Estonia. En él se compararon dos métodos volumétricos (con 2,6-dicloroindofenol y yodo) para la determinación del ácido ascórbico. Advirtieron que el contenido en vitamina C en miel era bajo, 4.88 mg/100 g de media para una relación de 160 muestras. A 9 de ellas se las adulteró con azúcar invertido artificial observándose una disminución del contenido de la vitamina (1.6 mg/100 g). A otras 7 muestras se las adulteró con sirope de almidón y sorprendentemente daban una media mayor, 12.9 mg/100 g. Concluyeron que las mieles que provenían de abejas alimentadas con caña de azúcar no contenían nada de ácido ascórbico, y que las mieles de color marrón o marrón oscuro eran más ricas en vitamina C que las de color claro. Se realizó un ensayo de estabilidad de la miel en el tiempo y sometida a calor, determinándose que el contenido de vitamina C disminuía un 10% en un año, un 25% en dos años y un 50% en tres años y que al calentarla durante una hora entre 60°C y 100°C, la concentración de vitamina no se veía afectada. Por otro lado, los mismos investigadores [Griebel & Hess, 1940], compararon los contenidos de vitamina C en

¹ Por regla general, para decidir lo que constituye una cantidad significativa se considera un 15 % de la cantidad diaria recomendada (CDR) suministrada por 100 g o 100 ml o por envase, si este contiene una única porción.

mieles de menta (102.6 mg/100 g) y tomillo (311.1 mg/100 g) con otros tipos de mieles florales (7-22 mg/100 g). Se concluyó que, con excepción de la miel de tomillo y de menta, la miel no podía ser considerada como una fuente de vitamina C. A partir de la determinación del contenido de ácido ascórbico en el néctar de algunas plantas, se demostró que había una pérdida importante cuando el néctar se convertía en miel.

Haydak et al. [1942] estudiaron 29 muestras de miel de Minnesota, 31 de otras zonas de EEUU y 7 de otros lugares del mundo. Demostraron la existencia de varias vitaminas del grupo B y ácido ascórbico por métodos microbiológicos y químicos. La variación más grande que detectaron entre mieles se observó en los ácidos nicotínico y ascórbico. El contenido de ácido ascórbico en estas mieles estaba comprendido entre 0.6-5.4 mg/100 g.

En la actualidad, los métodos habitualmente utilizados para la determinación de vitamina C en mieles son: **colorimétricos** previa derivatización con un oxidante como el 2,6-dicloroindofenol [Ferreira et al., 2009] o el yodo, con posterior precipitación con 2,4- dinitrofenilhidrazina [Krishna Kishorea et al., 2011]; por **volumetría** con 2,6-dicloroindofenol (ensayo de Tilmans) [AOAC,2005; Kesić et al., 2009; Guler et al., 2007] o yodométrica [Matei et al., 2004]; también se han usado métodos **cromatográficos** tanto en modo elución en gradiente [Gheldof et al., 2002; Álvarez-Suárez et al., 2010a; Ciulu et al., 2011] como en isocrático [Castro et al., 2001]. La determinación de vitamina C en mieles también ha sido llevada a cabo por un método **amperométrico**, usando un electrodo de oro modificado con paladio acoplado con un análisis de inyección en flujo (FIA) y un reactor tubular que contenía inmovilizada la enzima ascorbato-oxidasa [Da Silva et al., 2012]. Se compararon los resultados con los obtenidos por valoración yodométrica, obteniendo una buena correlación, con la ventaja de los bajos límites de cuantificación (0.086 mg/L) de la técnica amperométrica.

Recientemente Matei et al. [2004] han cuantificado vitamina C (además de algunos elementos traza como Ni, Mn, Fe, Cr) en mieles de tilo, acacia y mielato hallándose niveles muy altos, del orden de 200mg/100 g. Aunque las mayores concentraciones se encontraron en otro producto de la colmena, los propóleos (364 mg/100 g). Cuando se llevaron a ebullición estos productos, se observó una pérdida de ácido ascórbico de más de un 50%. El análisis de esta vitamina en 7 mieles

monoflorales brasileñas no ha dado valores tan elevados como los anteriores, el valor máximo encontrado fue de 6.20 mg/100 g de ácido ascórbico [Da Silva et al., 2012]. Del mismo orden fueron los valores máximos detectados en el análisis de 12 tipos de mieles italianas (4 mg/100 g para mieles de fresa) [Ciulu et al., 2011] y algo superiores en 4 tipos de mieles monoflorales malayas (36.09 mg/100 g en miel de Tualang) [Krishna Kishorea et al., 2011].

Por otro lado, en varios estudios realizados sobre la presencia de componentes antioxidantes en mieles, se han analizado los contenidos de vitamina C como parte de su potencial antioxidante. Gheldof et al., [2002] no detectaron ácido ascórbico al analizar por HPLC en gradiente (KH_2PO_4 (pH 4.5)/metanol) varias mieles monoflorales justificando el hecho en que dichas mieles eran comerciales, y a causa del procesado y almacenaje los niveles finales de ácido ascórbico podrían disminuir con respecto a la miel cruda (sin calentar). Comprobaron que le ocurría lo mismo a algunas enzimas con actividad antioxidante. Mediante un método cromatográfico similar al anterior, Álvarez-Suárez et al. [2010a] tampoco detectaron la vitamina C en varias mieles cubanas, no procesadas, de diferente origen botánico. La vitamina C se analizó en mieles portuguesas como parte del estudio de la actividad antioxidante. Los valores medios obtenidos, analizados con un método espectrofotométrico con 2,6-diclorofenol indofenol, fueron muy parecidos (en torno a 14 mg/100 g) para los tres tipos de mieles analizadas, que fueron seleccionadas por la intensidad de color (claro, medio y oscuro). No se obtuvo correlación relevante con la capacidad antioxidante total, descartando también una posible relación entre la concentración de vitamina C y el color [Ferreira et al., 2009]. Lo contrario se demostró en otro estudio sobre antioxidantes, en el que se obtuvo una buena correlación con la actividad antioxidante y se asoció una coloración oscura con altos contenidos de esta vitamina. La coloración oscura se refería a las denominadas mieles de bosque (fundamentalmente de mielato) frente a las de acacia [Kesić et al., 2009]. Esta gran disparidad de resultados entre los distintos estudios nos lleva una vez más a establecer la importancia del origen botánico de la miel en su composición, al menos en los componentes minoritarios.

El contenido de vitamina C también ha sido utilizado para detectar adulteraciones. Se investigaron los parámetros que podían ser importantes a la hora de discriminar entre miel pura y miel adulterada con sacarosa. Entre otros se estudió

el contenido en ácido ascórbico, observando que la miel adulterada con sacarosa tenía un contenido menor en vitamina C (11.23 mg/100 g) que la miel sin adulterar (33.92 mg/100 g) [Guler et al., 2007].

El contenido de azúcares, componentes mayoritarios de la miel con un 95% del peso seco del producto, se ha utilizado en numerosas ocasiones en la clasificación de mieles monoflorales, sobre todo los azúcares mayoritarios (monosacáridos): fructosa y glucosa, así como las relaciones fructosa/glucosa (F/G) y glucosa/agua (G/W). Según Bogdanov et al. [2004] parece que los azúcares minoritarios (polisacáridos), tienen un bajo valor de diagnóstico debido a que son producidos principalmente por la enzima invertasa con la excepción de la melezitosa y la maltotriosa excelentes indicadores de la miel de mielada. Es posible la identificación del origen botánico de las mieles y la posibilidad de adulteración mediante el análisis del perfil de oligosacáridos, en combinación con un análisis estadístico multivariante, Anklam [1998]. En una revisión bibliográfica sobre marcadores florales en miel, se llegó a la conclusión que la composición de azúcares es más fiable para la clasificación y autenticación en los casos en que la miel monofloral tenga una gran cantidad de néctar de la planta dominante, que cuando esta fracción se reduce, entonces la interpretación de los resultados es más compleja y casi inútil en la determinación del origen floral de cada miel [Kaškonienė&Venskutonis, 1998].

Sobre la utilización de los análisis estadísticos, quimiométricos, de los parámetros clásicos y otros parámetros (minerales, polifenoles, compuestos volátiles, aminoácidos, etc.) usados para la clasificación de mieles monoflorales, se han publicado un gran número de artículos. Al no ser posible la utilización de un solo parámetro de rutina para clasificar entre mieles monoflorales, se han aplicado métodos de análisis multivariante tales como: análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante (LDA) y análisis cluster (CA), a los diferentes parámetros de calidad (azúcares, conductividad eléctrica, pH, acidez, prolina, color, etc.) lográndose una buena clasificación entre tipos de mieles [Lazarević et al., 2012; Nozal-Nalda et al., 2005; González-Miret et al., 2005; López et al., 1995; Etzold & Lichtenberg-Kraag, 2008].

Las mieles monoflorales pueden ser clasificadas correctamente con herramientas quimiométricas. El problema aparece al intentar diferenciar mieles

monoflorales de multiflorales. Por otro lado, los diferentes modelos estadísticos no han sido armonizados para el análisis rutinario en los laboratorios de mieles, debido a la inmensa variación en la composición de la miel y a la variación inter-laboratorios, que no permite una clasificación de rutina de mieles mono y multiflorales basado en los parámetros clásicos. Sin embargo, los métodos quimiométricos pueden ser útiles como herramienta de clasificación de mieles monoflorales en controles internos de los envasadores de miel, con la ventaja de permitir la clasificación de la miel tras el control de calidad rutinario [Bogdanov et al., 2004].

2. OBJETIVOS

1. Analizar el contenido en vitamina C de las principales mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.
2. Poner a punto un método de análisis rápido de vitamina C por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa, RP-HPLC.
3. Comparar los resultados obtenidos por RP-HPLC con un método oficial para el análisis de vitamina C, Método 967.21 AOAC, con objeto de comprobar y garantizar la exactitud de los resultados.
4. Evaluar la estabilidad de la vitamina C en mieles a diferentes temperaturas de almacenaje.
5. Estudiar el contenido de azúcares mayoritarios en las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.
6. Clasificar los distintos tipos de miel de acuerdo a su origen botánico. Buscar posibles marcadores botánicos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y patrones

Los patrones de vitamina C, ácido L-ascórbico, D(+)glucosa y D(+)sucrosa fueron suministrado por Fluka (Madrid, España). El patrón de D(-)fructosa fue proporcionado por Sigma-Aldrich (Madrid, España). El ácido sulfúrico, H_2SO_4 , y el ácido oxálico, $C_2H_2O_4$, así como el 2,6-diclorofenol indofenol (sal sódica 2-hidrato) y la disolución valorada de yodo 0.05 M fueron servidos por Panreac (Barcelona, España). El ácido metafosfórico, HPO_3 , fue suministrado por Sigma-Aldrich (Madrid, España). El

disolvente acetonitrilo de grado HPLC fue distribuido por Sharlab (Mafrid, España). El agua ultra pura se obtuvo mediante un equipo Milli-Q de Merck Millipore (Billerica, EEUU).

3.2. Muestras de miel

Las muestras de los diferentes tipos de miel fueron 11 de castaño, 9 de espliego, 16 de tomillo, 11 de romero, 12 de viborera y 5 mielatos. Para la determinación de la vitamina C se estudiaron 19 mieles multiflorales adicionales. Todas las mieles proceden de Castilla-La Mancha.

3.3. Instrumentación

Sistema de HPLC de Merck-Hitachi (Tokio, Japón) compuesto por: una bomba modelo L-6200, un horno termostático para la columna T-6300, un sistema de inyección automático AS-2000, un detector UV-visible modelo L-4250 para el análisis de la vitamina C, un detector de índice de refracción modelo RI-71 para la determinación de azúcares y una interfase D-6000. El software utilizado para la adquisición y tratamiento de los datos es D-6000 Chromatography Data Station.

En la determinación de vitamina C por HPLC se empleó una columna Lichrosorb RP-18 10µm 150mm x 4.0mm de Merck (Darmstadt, Alemania). La temperatura de la columna fue de 25°C. Para el análisis cromatográfico de los azúcares fructosa, sucrosa y glucosa se utilizó una columna Lichrospher 100 NH₂ (5 µm) de Merck (Darmstadt, Alemania). La temperatura de la columna fue de 40°C.

3.4. Procedimiento

3.4.1. Determinación de ácido ascórbico o vitamina C

3.4.1.1. Cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa, RP-HPLC

La determinación de la vitamina C se ha realizado por RP-HPLC en modo isocrático con detección UV a 245 nm. Se ha empleado como fase móvil H₂SO₄ 0.01% (v/v) a pH 2.5, con un flujo de fase móvil de 0.9 mL/min. La concentración se ha determinado por el método del patrón externo, en un intervalo de concentraciones de

vitamina C comprendido entre 0.11 mg/L y 276.70 mg/L. Las disoluciones patrón de vitamina C se preparan disolviendo la cantidad correspondiente en HPO_3 0.05 M. La sensibilidad del método se obtuvo como la pendiente de la recta de calibrado. Los límites de detección y de cuantificación se calculan como la concentración que produce una señal igual a 3 o 10 veces el error de la ordenada en el origen. La robustez del método se obtiene como la desviación estándar relativa (RSD) correspondiente a la pendiente de 10 rectas de calibrado en días diferentes. Cada patrón se prepara por triplicado y cada uno se inyecta 3 veces en el sistema cromatográfico.

Para analizar las muestras se disuelven 5 g de miel en 25 mL de ácido metafosfórico 0.05 M. Posteriormente se filtran con filtro de membrana de acetato de celulosa 0.45 μm . Cada muestra de miel se prepara por triplicado y cada una se inyecta 3 veces en el sistema cromatográfico.

3.4.1.2. Volumetría redox con el reactivo 2,6-diclorofenol indofenol

El reactivo se prepara disolviendo 200 mg de la sal sódica 2-hidrato en 80 mL de agua destilada. Se calienta a 50°C con agitación magnética, se deja enfriar y se enrasa a 500 mL. La disolución preparada se valora con una disolución de ácido ascórbico de unos 100 mg/L, previamente valorada con una disolución patrón de yodo 0.05 M. El método empleado es el descrito por la AOAC internacional, método 967.21 [2005]. Las muestras de miel se prepararon disolviendo 5 g de miel en 25 mL de ácido oxálico al 2% (v/v) y filtración en filtro de pliegues. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

3.4.2. Determinación de fructosa y glucosa por cromatografía líquida de alta eficacia

Para la determinación de azúcares se ha seguido un método por HPLC en modo isocrático con detección por índice de refracción, desarrollado por Bogdanov [1997], y utilizado como procedimiento de rutina en el Laboratorio de Miel del Centro Agrario de Marchamalo. La fase móvil consiste en una fase hidro-orgánica acetonitrilo 87% (v/v)/ H_2O 13% (v/v) con un flujo de fase móvil de 1.2 mL/min. Se ha utilizado el método del patrón externo, y para el análisis de las muestras se disuelven 0.5 g de miel en 10 mL de agua ultrapura, y a continuación se filtra con filtro de membrana de

nylon de 0.45 μm . Cada muestra se prepara por triplicado y cada una se inyecta 3 veces en el sistema cromatográfico.

3.5. Tratamiento estadístico

Los análisis estadísticos se han realizado con los programas estadísticos Statgraphics versión 5.1 para Windows y SPSS Statistics 19.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se detalla el análisis de varios componentes químicos de las mieles de Castilla-La Mancha, como son la vitamina C y el contenido en azúcares mayoritarios (glucosa, fructosa y sacarosa). Estos datos junto con los parámetros físico-químicos (pH, conductividad eléctrica, HMF, humedad, acidez libre y color) de estas muestras, se utilizan para intentar mejorar la discriminación de los seis tipos de miel comentada en el capítulo II, apartados 4.2 y 4.4.

4.1. Determinación de ácido ascórbico o vitamina C

4.1.1. Análisis de vitamina C por RP-HPLC

El conocimiento del contenido en vitamina C en miel es relevante ya que, como se comentó en la introducción de esta memoria, es la vitamina mayoritaria en este alimento y es a la vez un potente antioxidante natural. Esta vitamina se ha determinado en miel por diversos métodos, principalmente cromatográficos pero también volumétricos, como el método oficial propuesto por la AOAC 967.21 [AOAC, 2005] para preparados vitamínicos y zumos. Este último método consiste en una valoración redox con 2,6-diclorofenol indofenol. Es útil para mieles claras, pero para mieles oscuras no sería tan fiable debido a que no se ve claramente el cambio de viraje de la valoración. En este trabajo se utilizó este método además de un método cromatográfico, comparándose finalmente los resultados obtenidos por ambas técnicas.

El método de análisis de ácido ascórbico por HPLC se ha llevado a cabo con una columna de fase inversa y una fase móvil acuosa de H_2SO_4 0.01% a $\text{pH}=2.5$. A este pH tan ácido, el ácido ascórbico estará en su forma neutra, reteniéndose en la fase

estacionaria. Esto no sucedería a pH superiores ya que se el analito y se cargaría negativamente, disminuyendo drásticamente su afinidad por este tipo de relleno, lo que hace que se eluya prácticamente con el tiempo muerto de la columna, imposibilitando así su análisis.

El pico cromatográfico del ácido ascórbico aparece a un tiempo de retención de 2.5 minutos como se muestra en la figura III.1.

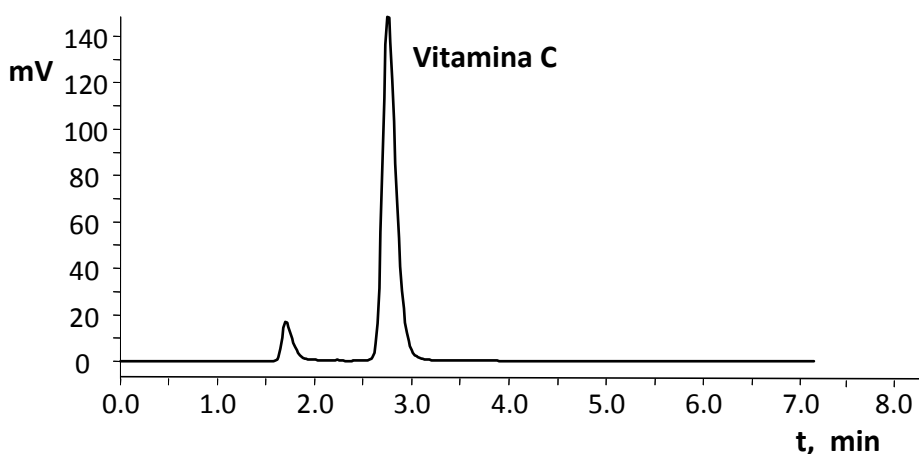


Figura III.1. Cromatograma de la determinación de una disolución patrón de ácido ascórbico, vitamina C, con una fase móvil de H_2SO_4 0.01%/pH 2.5/25°C. Detección UV a 245nm.

A partir de la recta de calibrado se calcularon las características analíticas del método que se recogen en la tabla III.1. El intervalo lineal es muy amplio y adecuado para medir los niveles de vitamina C encontrados en las muestras, únicamente diluyendo la miel. El método tiene una buena sensibilidad y además tiene una RSD del 2.5% entre días con lo que se puede decir que las características analíticas del método son buenas.

4.1.2 Contenido de vitamina C en los diferentes tipos de miel de Castilla-La Mancha por RP-HPLC.

La determinación de ácido ascórbico se ha llevado a cabo en un total de 83 muestras de miel. En la tabla III.2 se detallan los valores medios, la desviación estándar

y los valores mínimos y máximos obtenidos por tipo de miel. La figura III.2 muestra como ejemplo el cromatograma de una muestra de miel de romero.

Tabla III.1. Características analíticas del método cromatográfico para la determinación de ácido ascórbico.

	Intervalo lineal (mg/L)	r	Sensibilidad (L/mg)	Robustez (%)	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Vitamina C	2.28 – 276.7	0.9996	26154.7	2.5	0.68	2.28

Tabla III.2. Contenido en vitamina C (mg/100 g) de los distintos tipos de miel de Castilla-La Mancha, por RPHPLC.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desviación estándar	Mínimo -Máximo
Romero	11	7.00	8.84	0.61 – 30.90
Espliego	9	1.82	1.07	0.70 – 3.64
Tomillo	16	95.37	38.78	27.11 – 170.92
Viborera	12	3.21	2.87	0.77 – 11.71
Castaño	11	5.80	5.67	1.03 – 19.76
Mielato	5	6.46	9.89	0.76 – 23.95
Multifloral	19	19.64	28.9	0.74 – 104.07

Como se puede observar en la tabla III.2 los valores de concentración de vitamina C obtenidos son elevados en valor medio para las mieles de tomillo mientras que en las mieles de espliego se obtiene una cantidad inferior a 2 mg/100 g de miel. Con el fin de evaluar las diferencias que existen entre las concentraciones de esta vitamina encontradas en cada tipo de miel teniendo en cuenta todos los valores de cada muestra analizada, se ha realizado una comparación estadística de los mismos.

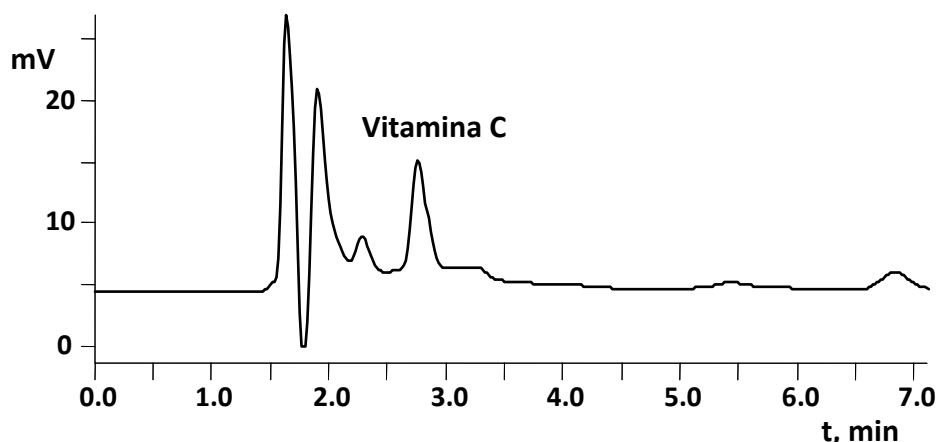


Figura III.2. Cromatograma de la determinación de ácido ascórbico, vitamina C, en una muestra de miel de romero. Fase móvil de H_2SO_4 0.01%/pH 2.5/25 °C. Detección UV a 245nm.

Cuando se realiza un test para la comparación de las varianzas e incluso simplemente observando la dispersión de valores para cada tipo de miel, se encuentra que las varianzas dentro de los grupos correspondientes a cada tipo de miel son muy diferentes. En la figura III.3 se puede observar que mientras que para las mieles de tomillo y multiflorales se obtiene una dispersión muy grande, para el resto de las mieles es mucho menor y para las de espliego la menor de todas. Por ello, en este caso no se puede realizar un análisis de la varianza (ANOVA) para comparar los tipos de miel.

Se observa que en la mayoría de las mieles de tomillo el contenido en esta vitamina es superior al encontrado en el resto de mieles monoflorales, con valores de hasta 170.92 mg/100 g. Esto puede suponer que dicha miel tendrá un gran poder antioxidante y que es diferente del resto de mieles estudiadas. Sin embargo, se ha encontrado una gran dispersión de valores entre las diferentes mieles de tomillo. Una posible explicación a esta dispersión de resultados puede estar en el tratamiento que se le ha dado a la muestra, ya que si se ha expuesto al calor o a la luz directa la vitamina se degradaría más fácilmente. Aún así, se puede proponer la miel de tomillo como “fuente de vitamina C” ya que el mínimo valor encontrado en las muestras

(27.11 mg en 100 g de miel) está por encima del 15% (12 mg) de su cantidad diaria recomendada (CDR = 80 mg). Incluso como “alto contenido de vitamina C”, denominación que se aplica cuando un alimento contiene al menos el doble de esta cantidad (24 mg) [DO L 285/9 de 29 de octubre de 2008; DO L 404/9 de 30 de diciembre de 2006].

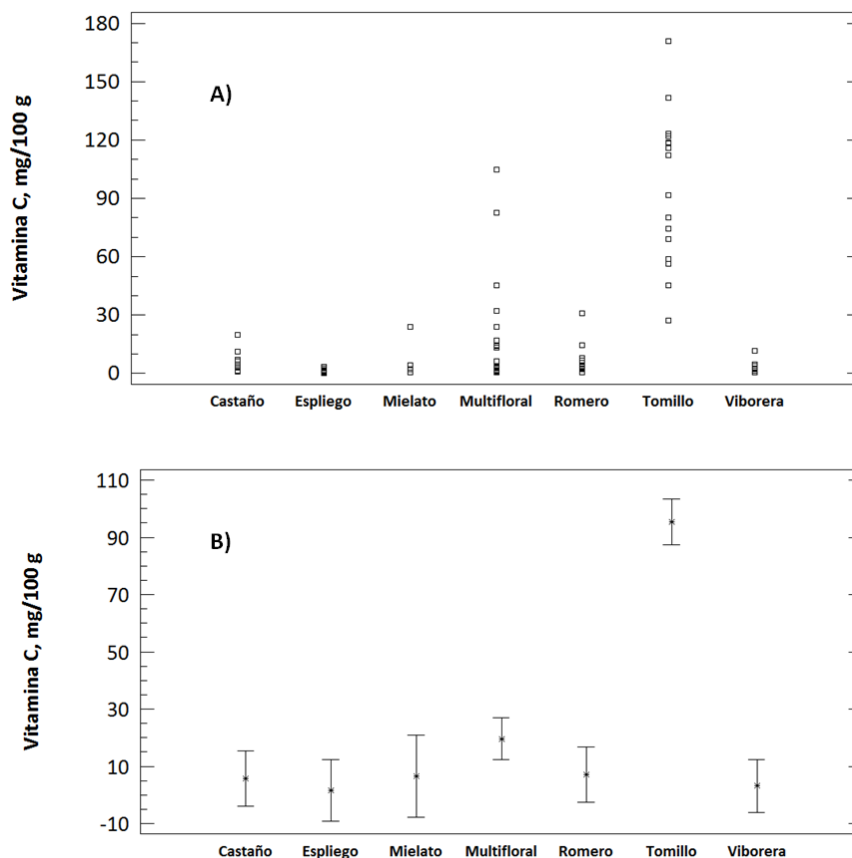


Figura III.3. Distribución de los valores de ácido ascórbico medidos por HPLC en mg/100 g en función del origen floral. A) Valores obtenidos para cada tipo de miel. B) Medias e intervalos de confianza para cada tipo de miel, nivel de confianza del 95%.

Como ya se suponía, las mieles multiflorales tienen un amplio intervalo de valores. Esta variabilidad es más fácilmente explicable ya que estas mieles no son originarias de un néctar mayoritario, si no de muchos, lo que hace que exista una gran diversidad botánica que llevará asociada enormes diferencias en la composición química.

4.1.3. Análisis de vitamina C por volumetría redox con el reactivo 2,6 diclorofenol indofenol

Con el fin de validar los resultados obtenidos por el método cromatográfico se analizaron las mismas muestras de miel mediante una volumetría redox con el 2,6-diclorofenol indofenol, método Tillmans [AOAC, 2005]. La tabla III.3 muestra los valores medios obtenidos por este método del contenido de vitamina C para las 83 muestras de miel estudiadas. Si se comparan los valores medios del contenido de vitamina C por HPLC y volumetría redox, tablas III.2 y III.3, no se observan grandes diferencias. Sin embargo es interesante comparar ambos métodos de análisis mediante estadística para comprobar que no existen diferencias estadísticamente significativas.

Para la comparación de los resultados obtenidos por las 2 técnicas analíticas se puede utilizar test t de muestras pareadas. Este test no se pudo utilizar porque se encontró que los datos no siguen una distribución normal y es un test paramétrico. Por ello, se empleó para la comparación de métodos un análisis de regresión lineal, representando los valores obtenidos por volumetría redox frente a los encontrados por RP-HPLC. Este método es además muy adecuado en este caso ya que los datos de concentración encontrados en las diferentes muestras presentan valores comprendidos en un intervalo muy amplio.

Para que los resultados obtenidos por ambos métodos sean considerados como iguales estadísticamente, la recta de regresión debe presentar un valor de la ordenada en el origen igual a cero, y un valor de pendiente igual a la unidad. Si al obtener los parámetros de la regresión, estos valores se encuentran en los intervalos de confianza para un 95% de dichos parámetros se considera que no difieren de forma estadísticamente significativa.

Tabla III.3. Contenido en vitamina C (mg/100 g) de los distintos tipos de miel de Castilla-La Mancha por volumetría redox.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desviación estándar	Mínimo -Máximo
Romero	11	8.33	10.61	0.86 – 38.45
Espliego	9	2.13	1.36	0.26 – 4.45
Tomillo	16	102.45	40.97	28.08 – 169.19
Viborera	12	3.48	3.55	0.95 – 13.63
Castaño	11	6.96	2.95	1.34 – 11.8
Mielato	5	11.61	12.29	2.46 – 32.06
Multifloral	19	22.08	30.26	1.59 – 110.19

La figura III.4 muestra la representación de los resultados de vitamina C por ambos métodos así como, los parámetros de la regresión. Como se puede observar el cero es un valor incluido en la ordenada para este nivel de confianza y la pendiente incluye el valor ideal de 1. Así, se concluye que ambos métodos no presentan diferencias estadísticamente significativas.

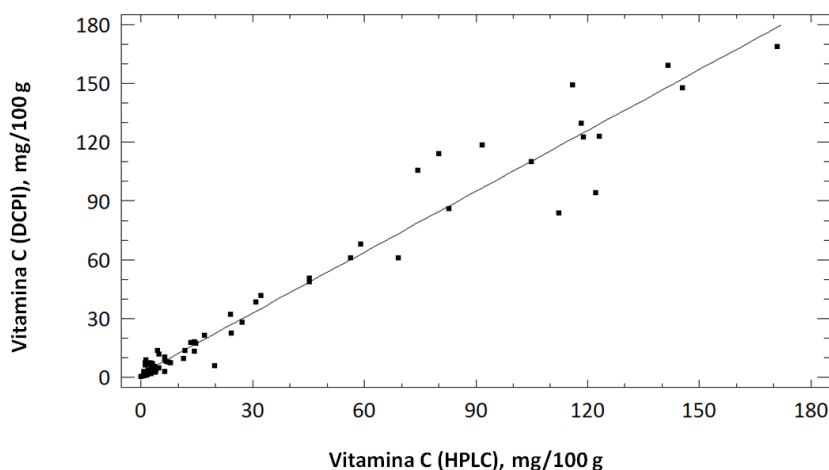


Figura III.4. Comparación mediante recta de calibrado de los resultados obtenidos por el método de la AOAC 967.21 (DCPI) y por HPLC

En definitiva, la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa permite determinar los niveles de concentración de la vitamina C de manera rápida y exacta. Además, el método es más simple, rápido y fiable (puede usarse con fiabilidad en mieles oscuras) que el método volumétrico.

4.1.4. Estudio de estabilidad de vitamina C en miel almacenada a diferentes temperaturas.

Es conocido que durante el almacenaje de la miel, aunque las condiciones sean óptimas, algunos componentes pueden sufrir alteraciones. Esto es muy habitual en los niveles de enzimas y en moléculas altamente inestables, como es el ácido ascórbico o vitamina C [Álvarez-Suárez et al., 2010a].

La estabilidad de la vitamina C en mieles no se ha investigado desde Griebel & Hess [1939], que estudiaron como disminuye el nivel de esta vitamina a lo largo de 3 años a temperatura ambiente. Posiblemente no se ha visto el interés a la hora de estudiar su estabilidad por los bajos niveles que habitualmente contiene la miel. En este estudio, las elevadas concentraciones que se encontraron en las mieles de tomillo han llevado a profundizar más en ello, investigando cómo afecta el modo de almacenaje en la estabilidad de esta vitamina y de esta forma, prevenir la degradación de este importante antioxidante.

El estudio consiste en dividir en tres partes la muestra de miel de tomillo, muestras T29, T31 y T32, y guardar una parte en congelación (-18°C), otra en refrigeración (4°C) y la última a temperatura ambiente, 25°C en la oscuridad (en una estufa) durante un año. La miel se almacenó en botes de cristal. Este ensayo se llevo a cabo en tres muestras de miel de tomillo diferentes con un alto contenido de vitamina C inicial (superior a 100 mg/100 g). Se analizaron los contenidos de vitamina C una vez a la semana durante el primer mes, a los 6 meses y al año.

Los resultados obtenidos se representan en la figura III.5. Como puede observarse a temperatura ambiente a partir del 6º mes la degradación del ácido ascórbico es muy importante, con una pérdida media de un 72% en un año (figura III.5.a).

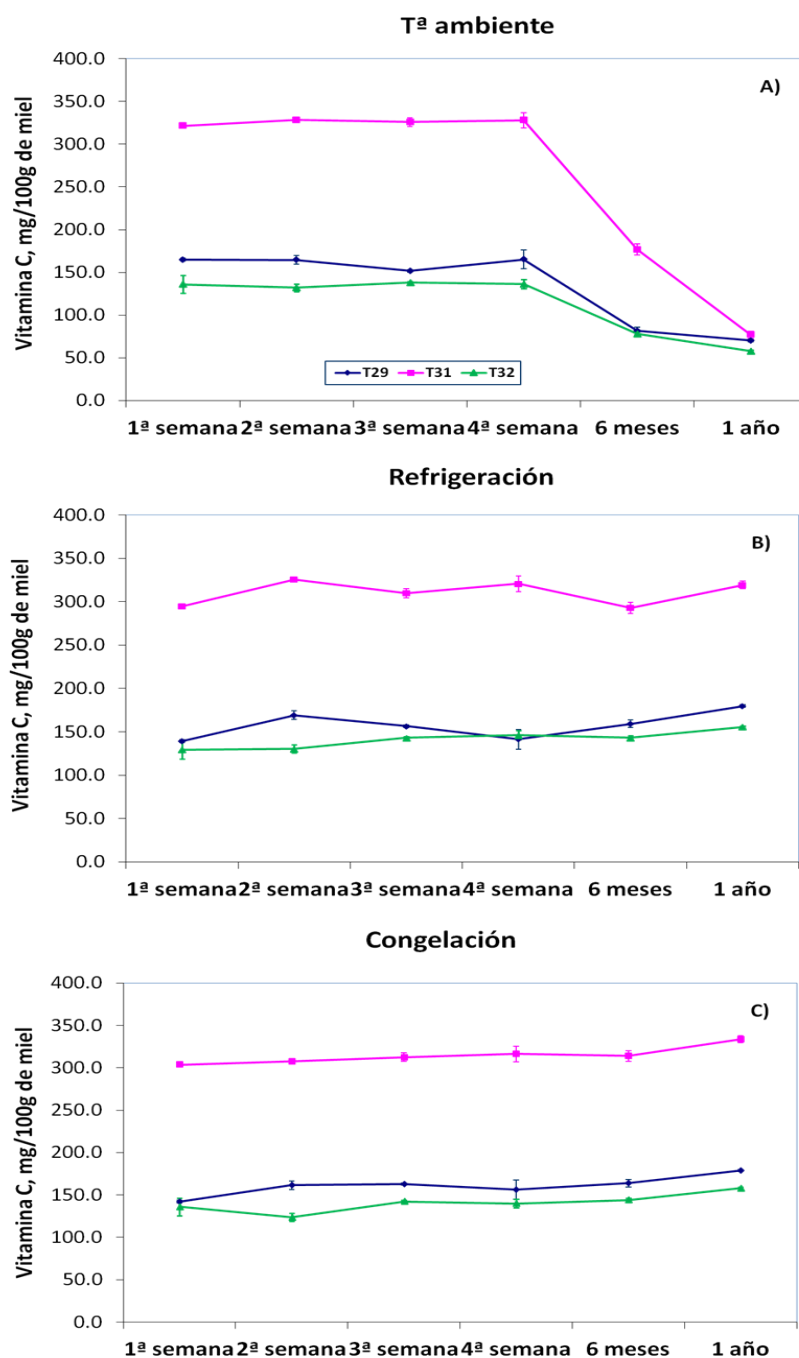


Figura III.5. Evolución del contenido de vitamina C durante 1 año en tres mieles de tomillo almacenadas a distintas temperaturas: a) a T ambiente (25 °C), b) en refrigeración (4 °C) y c) en congelación (-18 °C).

Esta pérdida no se observa al congelar o mantener en refrigeración las mieles (figura III.5.b y III.5.c). Esto nos indicaría que la mejor manera de conservar intacta la miel de tomillo es en refrigeración o en congelación, evitando almacenarla a temperatura ambiente, si no se va a consumir en un breve espacio de tiempo.

Además de este estudio se puede sacar como conclusión, que la vitamina C es bastante estable en mieles, en cualquiera de las formas de almacenaje, ya que hasta los 6 meses apenas se nota variación en la concentración de esta molécula, bien conocida por su inestabilidad. El pH ácido de la miel posiblemente ayude a conservar este antioxidante natural. Griebel & Hess [1939] observaron una pérdida de vitamina C bastante menor durante el primer año que la que se ha encontrado en este trabajo, únicamente de un 10%, pero no se detalla en el estudio si todo el tiempo estuvo la muestra a 25°C o dependiendo de la época del año la temperatura ambiente fue variando. En este estudio estas condiciones fueron fijadas para controlar totalmente las condiciones de almacenaje.

4.2. Azúcares mayoritarios

Son los componentes mayoritarios de la miel, de ahí la importancia de conocer su contenido.

A) FRUCTOSA

Es el principal azúcar de frutas, hortalizas y verduras, y el componente mayoritario en la miel. Es el azúcar que proporciona un sabor más dulce, más del doble que sacarosa y glucosa.

En la tabla III.3 se observa que las mieles con mayor contenido en fructosa son las de romero, seguidas muy de cerca por las de tomillo. Tiene sentido que la mayor cantidad media de fructosa corresponda a la miel de romero, ya que es la que tiene el sabor más dulce entre las estudiadas. Las mieles espliego y viborera contienen menos fructosa y por último las mieles con un menor contenido son las de castaño y mielato, que coincide también que son las que organolépticamente resultan menos dulces.

Tabla III.3. Contenido en **fructosa** (g/100 g) de los distintos tipos de miel estudiados.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desv. estándar.	Mínimo - Máximo
Romero	11	41.01	5.67	30.04 – 48.11
Espliego	9	37.72	2.85	31.63 – 41.09
Tomillo	16	40.69	1.31	37.89 – 42.62
Viborera	12	36.21	2.18	29.29 – 37.36
Castaño	11	31.67	1.59	30.77 – 36.22
Mielato	5	30.35	2.89	28.10 – 36.25

B) GLUCOSA

Tras la fructosa es el siguiente componente en orden de concentración en la miel.

Tabla III.4. Contenido en **glucosa** (g/100 g) de los distintos tipos de miel estudiados.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desv. estándar.	Mínimo - Máximo
Romero	11	37.76	3.63	31.88 – 40.95
Espliego	9	29.53	1.78	26.73 – 33.07
Tomillo	16	32.00	1.57	27.76 – 33.89
Viborera	12	31.38	3.54	24.94 – 36.76
Castaño	11	26.75	2.01	25.11 – 31.38
Mielato	5	20.22	2.10	18.57 – 24.00

Como se puede observar en la tabla III.4, con los resultados obtenidos para glucosa en estas mieles, sucede algo parecido a lo que ocurría con la fructosa, las mieles que contienen mayor concentración son las de romero y las de menor concentración, los mielatos. Concentraciones intermedias entre las dos y por orden creciente de concentración tienen las mieles de castaño, espliego, viborera y tomillo.

C) SACAROSA

Se analizó, a la vez que los dos monosacáridos anteriores, el disacárido sacarosa, pero no se detectó pico en ninguna de las muestras analizadas, por lo que no se recogen los resultados de este carbohidrato en forma de tabla.

D) INDICES FRUCTOSA+GLUCOSA, FRUCTOSA/GLUCOSA Y GLUCOSA/AGUA

Al sumar los azúcares mayoritarios, Fructosa+Glucosa (F+G) se observa la misma tendencia que con fructosa y glucosa, las mieles de romero son las que mayor contenido en azúcares mayoritarios tienen, seguidas de las de tomillo, espliego, viborera, castaño y en último lugar mielato, que está en concordancia con lo que se conocía de este tipo de producto de la colmena, que es pobre en ambos monosacáridos y rico en di, tri y superiores combinaciones de sacáridos (tabla III.5).

Tabla III.5. Azúcares totales (g/100 g) (F+G), índice de Fructosa/Glucosa (F/G) y relación entre glucosa y el contenido en humedad (G/W) de los distintos tipos de miel estudiados.

Tipo de miel	n	Fructosa + Glucosa	Fructosa/Glucosa	Glucosa/Agua
Romero	11	77± 8	1.1 ± 0.1	2.3 ± 0.3
Espliego	9	66± 4	1.23 ± 0.07	1.8 ± 0.2
Tomillo	16	70± 2	1.33 ± 0.06	1.8 ± 0.1
Viborera	12	65± 5	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.2
Castaño	11	60± 3	1.18 ± 0.07	1.9 ± 0.2
Mielato	5	54± 5	1.49 ± 0.08	1.4 ± 0.1

Los índices Fructosa/Glucosa (F/G) y Glucosa/Agua (G/W) son indicativos de la tendencia a la cristalización, así si el ratio G/W es menor de 1.7 y el F/G mayor de 1.3 la miel no cristalizará, como suele cumplirse en los mielatos. Por otro lado, si la proporción G/W está por encima de 2.1 la miel cristalizará rápidamente como ocurre con las mieles de romero [Manikis & Thrasyvoulou, 2001].

4.3. Discriminación de las mieles por su origen botánico, parte C

Una vez obtenidos las concentraciones de vitamina C, fructosa y glucosa, se ha realizado un análisis de componentes principales y un análisis lineal discriminante con el objetivo de una mejor discriminación de los seis tipos de miel. Para ello se han utilizado los parámetros siguientes: acidez libre, humedad, conductividad eléctrica, pH, HMF, glucosa, fructosa y vitamina C, de 64 muestras de mieles monoflorales.

4.3.1. Análisis de componentes principales, PCA

Para comenzar este análisis se elige el número de componentes principales con la ayuda de los gráficos de sedimentación y la tabla de autovalores, que muestra el porcentaje de varianza acumulada explicada. La tabla III.6 y la figura III.6 muestran los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales para los valores medios de los diez parámetros estudiados para cada tipo de miel.

Tabla III.6. Autovalores y porcentaje de varianza para los cinco componentes principales

Componente número	Autovalor	Porcentaje de varianza	Porcentaje de varianza acumulada
1	5.23344	65.418	65.418
2	1.58111	19.764	85.182
3	0.87056	10.882	96.064
4	0.21302	2.663	98.727
5	0.10186	1.273	100.00

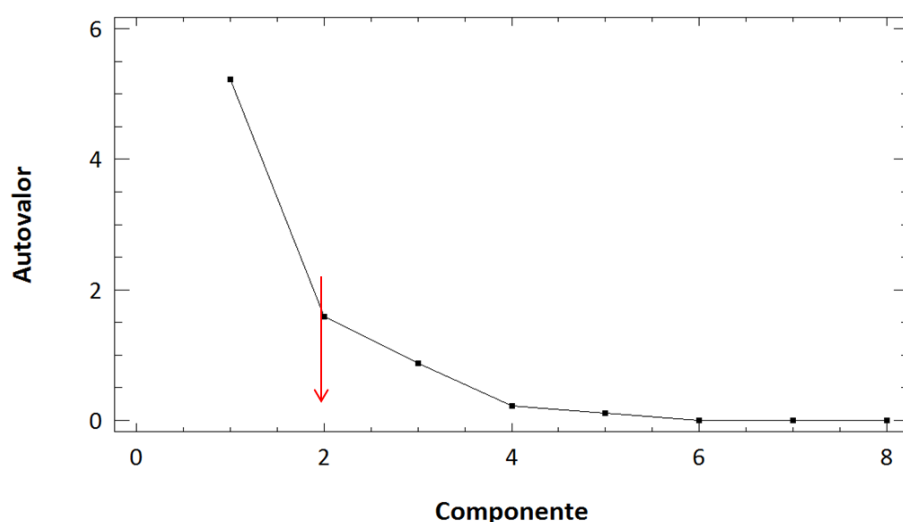


Figura III.6. Gráfico de sedimentación

Como se observa en la tabla III.6 los dos primeros componentes principales explican el 85.2% de la varianza, y por otra parte los valores más elevados del autovalor son los que corresponden a esos dos componentes. Además, en el grafico de sedimentación se observa que el número de componentes a utilizar son dos. Fijados los dos primeros componentes, la tabla III.7 muestra la tabla de cargas o pesos de los componentes.

Tabla III.7. Tabla de pesos de los componentes

	COMPONENTE 1	COMPONENTE 2
Acidez libre	0.40942	-0.24886
Conductividad eléctrica	0.42125	0.00342
HMF	-0.10588	0.66724
Humedad	-0.40663	-0.03874
pH	0.40038	-0.22538
Fructosa	-0.39000	-0.31823
Glucosa	-0.37655	-0.08469
Vitamina C	-0.15544	-0.57628

La figura III.7 resume de forma gráfica lo observado en la tabla de pesos de los componentes.

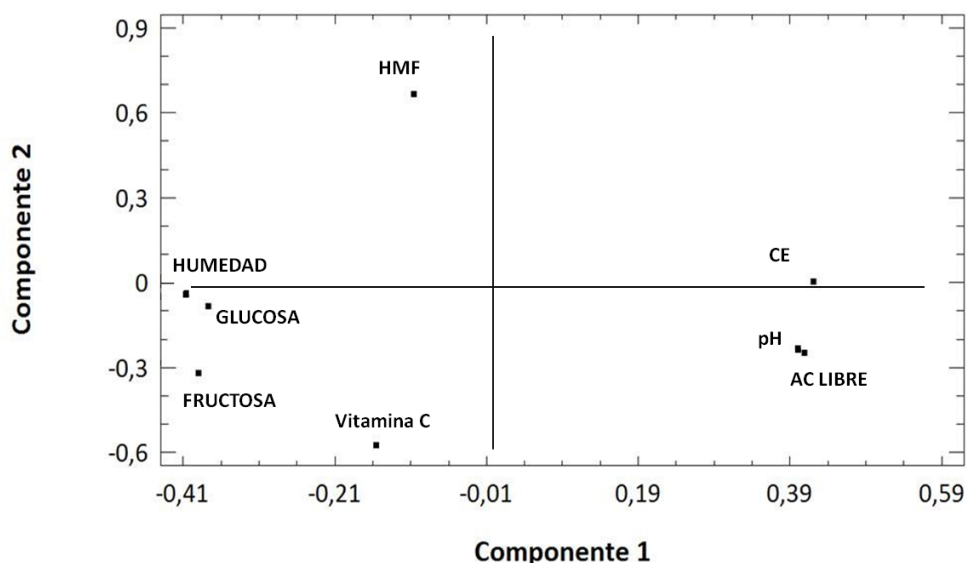


Figura III.7. Gráfico de cargas o pesos de los componentes

El primer componente, C1, está directamente correlacionado con la acidez libre, el pH, y la conductividad eléctrica, su valor aumenta cuando aumentan los valores de dichas variables, es decir, C1 explica una parte importante de la varianza asociada a los tres parámetros. El segundo componente, C2, tiene una correlación directa muy fuerte con la variable HMF, en este caso explica casi toda la varianza asociada a la variable. Las variables humedad, glucosa fructosa y vitamina C estarían correlacionadas con el componente 3.

La figura III.8, gráfico doble o *biplot*, representa la superposición del gráfico de cargas con el diagrama de dispersión de las muestras en relación a los dos componentes.

Cada punto representa un conjunto de mieles según su origen botánico. Los puntos correspondientes a mieles de castaño y mielatos tienen valores elevados del componente principal 1 y por lo tanto, se esperan para dichas muestras valores de acidez libre, pH y conductividad eléctrica elevados.

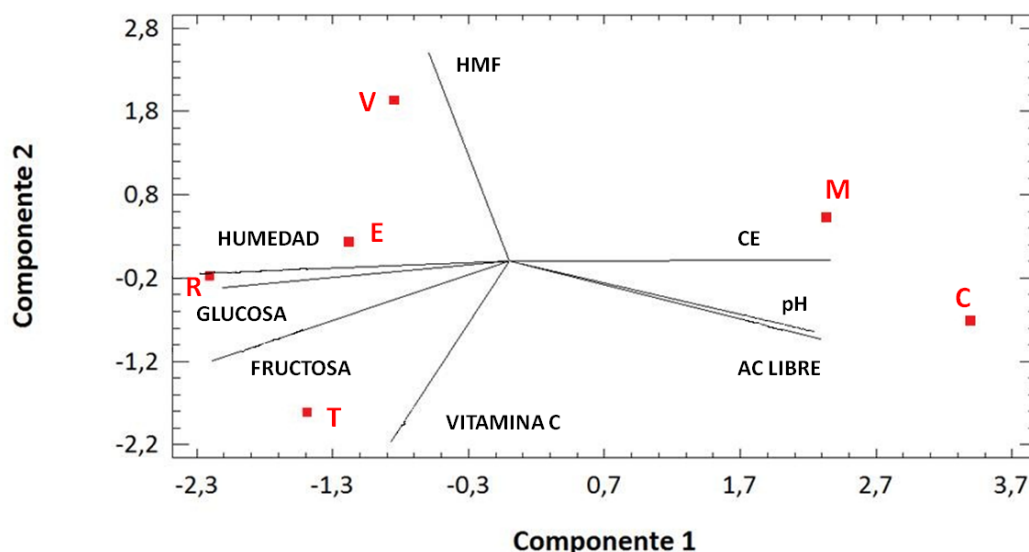


Figura III.8. Diagrama doble o biplot (C:castaño, E:espliego, M:mielatos, R:romero, T:tomillo, V:viborera)

De la misma forma las mieles de la región de la Alcarria, romero, espliego y tomillo tendrán los valores más bajos de estas variables. Con respecto a las mieles de viborera, tienen un valor elevado del segundo componente principal y por tanto poseerán los mayores valores de HMF. La miel de tomillo posee un valor elevado del componente 3, muy relacionado con el contenido de vitamina C.

4.3.2. Análisis discriminante lineal, LDA

Con los parámetros utilizados en el análisis de componentes principales se ha realizado un análisis discriminante con el objetivo de mejorar la clasificación obtenida para los seis tipos de mieles en los apartados 4.2.2 y 4.4.2 del capítulo II. Se ha llevado a cabo un análisis por pasos o *stepwise* para discriminar aquellas variables que tienen una mayor significación estadística en la clasificación. En este caso han resultado ser la conductividad eléctrica, vitamina C, fructosa y glucosa. Así se han introducido los 64 valores correspondientes a las diez variables para cada tipo de miel, y se han obtenido

las funciones discriminantes, cuyos autovalores, correlación canónica, estadístico Lambda de Wilks y porcentaje de varianza se presentan en la tabla III.8

Tabla III.8. Resumen del análisis discriminante

Función discriminante	Autovalor	Porcentaje de varianza	Correlación canónica	Lambda de Wilks	p-valor
1	7.52899	62.73	0.93955	0.01168	0.000
2	3.08272	25.68	0.86895	0.09967	0.000
3	1.34059	11.17	0.75681	0.40694	0.000
4	0.04989	0.42	0.21798	0.95248	0.249

Para valorar la significación estadística del conjunto de las cuatro funciones discriminantes obtenidas se estudian los diferentes estadísticos, Lambda de Wilks y su p-valor, los valores de la correlación canónica y los autovalores, y el porcentaje de la varianza total explicada. La tabla III.8 indica que, a pesar que el p-valor es inferior a 0.05 para tres de las funciones discriminantes, las dos primeras son adecuadas para llevar a cabo la clasificación de los seis tipos de miel, con un 88.41% de varianza explicada, correlaciones canónicas cercanas a la unidad y valores del estadístico de Wilks próximos a cero. La tabla III.9 muestra la clasificación llevada a cabo para los seis tipos de mieles de acuerdo a las dos primeras funciones discriminantes, asimismo la figura III.9 muestra el gráfico de dichas funciones.

Tabla III.9. Clasificación de los seis tipos de miel, en porcentaje

TIPO	GRUPO DE PERTENENCIA PRONOSTICADO					
	CASTAÑO	ESPLIEGO	MIELATO	ROMERO	TOMILLO	VIVORERA
CASTAÑO	100	0	0	0	0	0
ESPLIEGO	0	88.9	0	0	11.1	0
MIELATO	0	0	100	0	0	0
ROMERO	0	27.3	0	54.6	0	18.1
TOMILLO	0	0	6.3	12.5	87.5	6.2
VIVORERA	8.3	25.1	8.3	8.3	0	50.0

CLASIFICACIÓN CORRECTA: 78.1

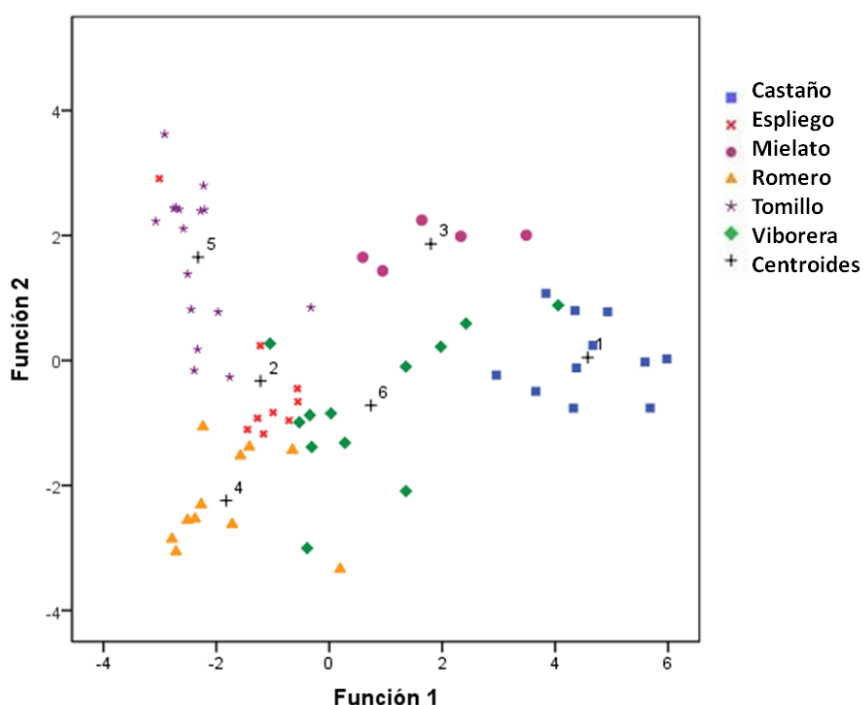


Figura III.9. Gráfico de funciones discriminantes

Obtener un porcentaje de tipos de miel correctamente clasificados del 78.1%, ratifica la significación estadística de las funciones discriminantes. Las mieles de castaño, espliego y mielatos son clasificadas en su totalidad, las mieles de tomillo presentan una correcta clasificación con un porcentaje del 87.5, siendo las mieles de romero y de viborera las peor clasificadas. A este respecto, solo la mitad de los casos se asignaron correctamente (romero, un 54.6% y viborera, un 50.0%), siendo en ambos casos un 27.3% de romero y un 25.1% de viborera asignados a las mieles de espliego. Este comportamiento aunque no es lo ideal, en parte es lógico si tenemos en cuenta la variabilidad biológica de cada muestra, ya que las mieles no son puras, es decir no provienen de un único néctar, intervienen un gran número de flores y en consecuencia de néctares. Se puede concluir que los cuatro parámetros con significación estadística, conductividad eléctrica, vitamina C, fructosa y glucosa permiten una buena clasificación de las mieles en función del origen botánico.

Otro de los objetivos de este estudio es buscar posibles marcadores para diferenciar entre las variedades de miel monoflorales estudiadas de Castilla-La Mancha. De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible considerar los cuatro parámetros de influencia independientemente porque en alguno de ellos fue encontrada una variación en la fuente floral, pero ninguno puede ser usado como único y claro marcador del origen botánico. Particularmente, el contenido en vitamina C es claramente superior en las mieles de tomillo que en el resto, aunque los valores tienen una gran variabilidad dentro del grupo.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha determinado el contenido de vitamina C, ácido ascórbico, mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa y en modo isocrático. El método es rápido, sencillo y fiable, en comparación con el método volumétrico del 2,6-diclorofenol indofenol aplicado en numerosas ocasiones en otras investigaciones sobre mieles.
2. La vitamina C, potente antioxidante presente en todas las mieles analizadas, es de especial interés en las mieles de tomillo, cuyo valor medio es muy elevado, pudiendo considerarlo fuente de esta vitamina, además de poder ser considerado como un marcador de este tipo de miel.
3. La miel es un excelente preservador del ácido ascórbico, sobre todo si el producto se almacena en refrigeración o congelación.
4. Se han clasificado correctamente el 78.1% de las mieles de acuerdo a su origen botánico, con cuatro parámetros fundamentales, conductividad eléctrica, vitamina C, fructosa y glucosa.

Los resultados recogidos en este capítulo han dado lugar a la siguiente publicación:

Vitamin C and Sugar Levels as Simple Markers for Discriminating Spanish Honey Sources

Virginia León-Ruiz, Soledad Vera, Amelia V. González-Porto, and María Paz San Andrés
Journal of Food Science , 76, 2011, C356-C361

Vitamin C and Sugar Levels as Simple Markers for Discriminating Spanish Honey Sources

Virginia León-Ruiz, Soledad Vera, Amelia V. González-Porto, and María Paz San Andrés

Abstract: In this work, 7 Spanish honeys with different botanical origins were studied. The honey origins were rosemary, chestnut, lavender, echium, thyme, multifloral, and honeydew. The chemical compounds determined were ascorbic acid (vitamin C), hydroxymethylfurfural, and major sugar contents (glucose and fructose). The physicochemical parameters, pH, conductivity, moisture, free acidity, and color, were also measured. Vitamin C is an important antioxidant in food, and the possibility to use it as discriminate parameter among different honeys was studied. The determination of vitamin C in honey samples was carried out by 2 different methods, volumetric and chromatographic comparing the results by both statistically. Vitamin C content was higher in thyme honeys than in the other types; however a wide dispersion in the values was found. Through a linear discriminant analysis (LDA), conductivity, glucose, fructose, and vitamin C content were the most important discriminant parameters.

Keywords: ascorbic acid, honey analysis, HPLC, linear discriminant analysis, physicochemical parameters, vitamin C

Practical Application: Vitamin C content in different honey sources has been determined by a simple and rapid chromatographic method (less than 3 min) in honeys from 6 botanical origins. The results together with glucose and fructose content and some physicochemical parameters have been studied in order to discriminate the botanical origin of honeys and in the future certify their quality. A statistical LDA was applied to the data, and differentiation of honey sources was possible with very good agreement. The vitamin C content found in thymus honeys was significantly higher than in other types. This fact makes vitamin C a special marker for thymus honeys that have a higher antioxidant effect than the others giving it special properties. The identification of honey sources is essential for beekeepers in order to certify honeys for consumers.

Introduction

The majority of the honeys in the market contains significant nectar or honeydew contributions from several plant species, and are therefore called multifloral honeys. The term unifloral honey is used to describe a honey in which the major part of nectar or honeydew is derived from single plant species (Persano-Oddo and Piro 2004). In Europe more than 100 plant species originate unifloral honeys. For complete information on European unifloral honeys, the Intl. Honey Commission (IHC) conducted a comprehensive study through the collection of bibliographic data, and through information provided directly by members of IHC (Persano-Oddo and others 2004). In order to compare the results obtained by IHC with other European studies, an extensive review that includes all analytical data available in the literature, for the same type of honey, was carried out (Piazza and Persano-Oddo 2004).

At present, there is an increasing commercial interest to produce unifloral honeys, due to the therapeutic uses of certain honey

varieties. Also, the consumer would be important to have nutritional information of honey on the label, which is regulated for all foodstuffs by Regulation (EC) No. 1924/2006 and Regulation (EC) No. 108/2008 (OJEU 2006; OJEU 2008), and for honey by Regulation (EC) No. 110/2001 (OJEU 2002) of the European Parliament and the Council.

Honey is a natural bee product and its quality and composition depends on the botanical and geographic origin and climatologic conditions. Honey characterization is based on the determination of its chemical, physical, or biological properties. Pollen analysis of honey, or melissopalynology, is of great importance for quality control (Von der Ohe and others 2004). Honey always includes numerous pollen grains and honeydew elements that altogether provide a good fingerprint of the environment where the honey comes from.

In general, a honey is considered as coming predominantly from a given botanical origin (unifloral honey) if the relative frequency of the pollen of that taxon exceeds 45%. This percentage is not valid for over- or under-represented pollen plants; for example, rosemary, lavender, or citrus honeys are considered to be unifloral when only 10% to 20% of pollen from these species is present (Piazza and Persano-Oddo 2004).

Honey contains around 200 compounds (Tomoi-Sato and Go-Miyata 2000), and it is basically 20% water, 38% fructose, 31% glucose, 8% disaccharides (more than 20 are identified), 2% in other sugars, and the rest is other various substances as organic acids, enzymes, aromatic compounds, flavonoids, and vitamins.

MS 20100652 Submitted 6/11/2010, Accepted 11/22/2010. Authors León-Ruiz, Vera, and San Andrés are with Dept. de Química Analítica e Ingeniería Química, Facultad de Química, Univ. de Alcalá, Cta. Madrid-Barcelona, Km. 33.6, 28871-Alcalá de Henares (Madrid), Spain. Authors León-Ruiz and González-Porto are with Centro Agrario de Marchamalo, C/ Extremadura, s/n., 19180-Marchamalo (Guadalupe), Spain. Direct inquiries to author San Andrés (E-mail: repaz.sanandres@uah.es).

In the last compounds, the vitamins, the water-soluble vitamins, and specially vitamin C by its antioxidant character, are the most important ones.

In the last ten years, very few references on the determination of vitamin C in honey have found. Vitamin C determination was carried out traditionally by colorimetric method after derivatization in the presence of oxidants and by volumetric method in the presence of 2,6-dichloroindophenol (AOAC method 967.12 2005; Guler and others 2007; Ferreira and others 2009). Recently, vitamin C has been determined by reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) in isocratic mode, with a mobile phase of methanol/water at pH 2.5. This method is fast, it does not required sample treatment and the retention time for vitamin C is about 5 min (Castro and others 2001).

A gradient chromatographic method for the determination of vitamin C has been developed (Gheldof and others 2002), however despite the high number of honeys, the authors did not detect the presence of vitamin C in any of the samples.

Spain has several major areas for honey production, and one of the most important is the natural region from Castilla-La Mancha (Central Spain). In this area, origin denomination "La Alcarria honey" was registered and protected by the European Commission in 1996. This honey must have specific parameters in a range values to belong to this denomination (JCCM 1996).

Characterization of Spanish honeys of different floral type (for example, rosemary, lavender, willow, thyme) has also been done by using pollen analysis, physicochemical parameters, mineral content, and/or volatile composition data (Mateo and others 1992; Pérez-Arquillué and others 1995; Mateo and Bosch 1998; Soria and others 2004; Terrab and others 2004; Nozal and others 2005). Chemometric techniques appear to be the most powerful tools for characterizing and classifying honeys by geographical and botanical source. In this way, linear discriminant analysis (LDA) and principal component analysis are commonly employed to distinguish between honeys from different botanical sources (Mateo and Bosch 1998; Terrab and others 2002; Terrab and others 2003; Devillers and others 2004; Marini and others 2004; Soria and others 2004; Terrab and others 2004; González-Miret and others 2005; Nozal and others 2005; Consonni and Cagliani 2008; Etzold and Lichtenberg 2008).

The determination of vitamin C by RP-HPLC and by titration with the 2,6-dichloroindophenol and the classification by LDA of 7 Castilla-La Mancha honeys according to their floral origin are the purposes of this article. All the predictor variables have been chosen among the parameters routinely determined for the quality control of this product, with the only exception of the vitamin C data.

Material and Methods

Honey samples

The present study was conducted using 82 honeys from the region Castilla-La Mancha (central Spain) that were collected directly from beekeepers: chestnut (11), lavender (9), thyme (16), rosemary (11), echium (11), multifloral (19), and honeydews (5).

Samples were initially characterized by melissopalynological and sensorial analysis to determine the botanical source. Pollen analysis was carried out using the methods established by the Ind. Commission of Bee Botany (Louveaux and others 1978; Von der Ohe and others 2004).

Determination of physicochemical parameters

Some physicochemical parameters were analyzed using The Harmonised Methods of the Ind. Honey Commission (Bogdanov and others 2004).

Moisture levels were determined by noting the refractive index at 20 °C in an Abbe model NAR-1T refractometer (Tokyo, Japan).

Measurements of pH were performed potentiometrically at 20.0 °C in a 10% (w/v) solution of honey in freshly boiled distilled water using an Eutech System model XS PC510 pH-meter. The free acidity is obtained by plotting the neutralization curve with a titrated sodium hydroxide solution and determining the pH of the equivalence point.

Electrical conductivity was measured at 20.0 °C in a 20% (w/v) solution of honey (dry matter basis) in deionized water using a Radiometer CDM-83 conductimeter (Copenhagen, Denmark).

The determination of the hydroxymethylfurfural (HMF) content was based on the determination of UV absorbance of HMF at 284 nm with a Hitachi model U-1100 spectrophotometer (Krefeld, Germany).

The determination of sugar content (glucose and fructose) was done by HPLC but with refractometric detection (Merck RI-71). A mixture of acetonitrile:water (87:13, v/v) was used as a mobile phase, with a flow rate of 1 mL/min. Separation was carried out using a Lichrospher 100 NH₂ (5 µm), from Merck (Darmstadt, Germany) at 40 °C. Honey samples were dissolved to 5% (w/v) in water and filtered through a nylon syringe filter (0.45 µm).

Determination of color

Color parameters were established in the CIELAB system by reflection method (measuring geometry d/8°, illuminant D65, range 400 to 700 nm, observer 10°) using a Hitachi model U-1100 spectrophotometer.

Determination of vitamin C

2,6-dichloroindophenol titrimetric method (AOAC method for juices). The AOAC method involves a redox titration with 2,6-dichloroindophenol (AOAC International 2005). The honey samples were prepared by dissolving 5 g of honey in 25 mL of 2% oxalic acid (Panreac, Barcelona, Spain) and with folded filters filtration prior to the assessment.

High-performance liquid chromatography, RP-HPLC method. The determination of vitamin C was performed by an RP-HPLC method in isocratic mode, with a mobile phase of 0.01% (v/v) H₂SO₄ (Panreac), at pH 2.5, a flow of 0.9 mL/min, with UV detection at 245 nm, at 25 ± 1 °C. The method used was adapted from the work of Vázquez (Vázquez-Oderiz and others 1994). The chromatographic system (HPLC, Hitachi) consists of a model L-6200 pump, a thermostatic oven for column T-6300, an automatic injection system AS-2000, a UV-Vis L-4250 model detector, and interface D-6000. The software used for acquisition and data processing is the D-6000 Chromatography Data Station. The column used was a Lichrosorb RP-18 10 µm 150 mm × 4.0 mm, from Merck.

Standard solutions of vitamin C (Fluka, Madrid, Spain) were prepared by dissolving the corresponding amount in 0.05 M H₂PO₄ (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). All solutions were stored in the dark at 4 °C. The determination of vitamin C has been carried out by the external standard method. The range of concentrations of vitamin C used to perform the calibration line ranged between 0.11 and 276.70 mg/L. The method sensitivity was calculated as the slope of the straight line, with its corresponding units. The

detection and quantification limits were obtained from the straight line, as the amount of analyte that yields a signal equal to intercept plus 3 or 10 times the statistic $s_{y/x}$, which estimates the random errors in the y -direction (Miller and Miller 2000). The robustness was the relative standard deviation (RSD) of the slope of the calibration curve for 10 calibration curves obtained in different days.

Samples were prepared by dissolving 5 g of honey in 25 mL of 0.05 M HPO_3 , then filtered through a paper filter and prior to injection in the chromatographic system were filtered again through a 0.45 μm cellulose acetate membrane filter.

The statistical calculations in the linear discriminant multivariate analysis have been carried out using the statistical program STATGRAPHICS for windows 5.1.

Results and Discussion

Vitamin C analysis in honey samples by volumetric and chromatographic methods

The analysis of vitamin C in honeys has not assigned any official method. For this reason, vitamin C concentrations were obtained for all honeys by volumetric AOAC official method 967.21 for juices (AOAC method 967.12, 2005) and the results were compared with a proposed reverse phase chromatographic method (RP-HPLC). The chromatographic method is simple and rapid, consuming less than 4 min per sample. The results obtained by both methods were compared to validate the RP-HPLC method. Figure 1A shows the chromatogram of a vitamin C standard injected into the chromatographic system with a 0.01% H_2SO_4 mobile phase, pH = 2.5, and $T = 25^\circ\text{C}$. The retention time for vitamin C was 2.7 min, this time was lower than the one obtained in octadecyl silane column C18 (5 μm) with other mobile phases such as methanol: H_2O (15:85% v/v) in metaphosphoric acid at pH 2.5 (5.1 min) (Castro and others 2001) and H_2SO_4 at pH 2.2 (9 min) (Vázquez-Oderiz and others 1994).

The calibration curve was obtained by injecting different concentrations of vitamin C standards and its analytical characteristics determined. The parameters calculated were the linear range, sensitivity, robustness, detection limit, and quantification limit. The linear range was long enough (2.28 to 276.7 mg/L) to analyze all honey samples, and the method has a good sensitivity with a detection limit 0.68 mg/L and a 2.3 mg/L quantification limit value. In addition, an RSD of 2.5% between the slopes values was observed to determine the robustness. These characteristics were very good to determine the vitamin C content in the honey samples studied.

After the method was well established, 82 different honey samples with 7 different floral origins were analyzed, 11 chestnut, 9 lavender, 16 thyme, 5 honeydews, 11 rosemary, and 11 echium, including also 19 multifloral honeys. As an example, Figure 1B shows a chromatogram of a rosemary honey obtained in the same experimental conditions as Figure 1A.

As was stated above, in order to validate the chromatographic method as a useful method for vitamin C analysis in honey, samples analyzed by both methods (AOAC 967.21 and RP-HPLC) were compared to know if they were equal statistically. The paired t -test was not a correct test to use because the differences were not normally distributed. Therefore, a regression curve was used for comparing analytical methods. If each sample yields an identical result with both methods, the regression line will have a zero intercept and a slope of 1. As this situation never occurs due to random errors, even if systematic errors are entirely absent, an

intercept differing significantly from zero and a slope differing significantly from 1 are tested generally at the 95% significance level. Figure 2 shows the representation of the vitamin C values obtained for total analyzed honey samples by both methods in mg/100 g. The values of the intercept and slope obtained for the linear regression with their confidence limits were 1.63 ± 2.2 and 1.04 ± 0.05 , respectively. As can be seen, the zero intercept value is included in the confidence range, and again confidence range for slope includes the ideal value of 1.

It is important to note that the statistical method concludes that both methods have got the statistically same result in spite of the deviation that can be seen in a few values between methods. These deviations are relative errors because some of them are higher by RP-HPLC method and other by volumetric method.

Assuming that the HPLC method obtains the same values than the AOAC official method, the next studies were realized using the values obtained by HPLC which is a faster and simpler than volumetric method.

Vitamin C content found in the different honey sources

The vitamin C values obtained for 82 honey samples cited above were compared to look for statistical differences between each honey source group. This comparison of the vitamin C values can be made using a parametric test as ANOVA upon the results of

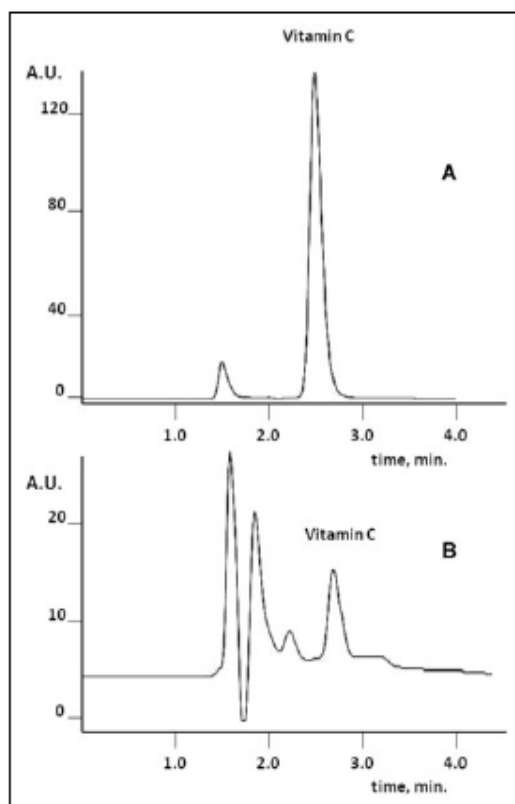


Figure 1—Ascorbic acid chromatogram with a mobile phase H_2SO_4 0.01%, pH = 2.5, and $T = 25^\circ\text{C}$. Detection: UV at 254 nm. (A) Standard solution and (B) rosemary honey sample.

each honey group. In our case, we have studied the conditions to apply this test but the results were not a normal distribution for vitamin C values and also, there was not a statistically equal variance between all honey groups. In spite of this, we consider to be very important the visual analysis of data distribution in the different honey groups. As can be seen in Figure 3, the vitamin C content is higher in the thyme honey group, reaching values close to 170 mg/100 g. This fact, lead us to think that this honey has a huge antioxidant effect and is different from the others in base to other vitamin C levels. However, this honey type shows a great dispersion in the values and its confidence interval is significantly higher than the others. In the lavender group, there was a wide confidence interval, but if we look at Figure 3A, a discrepant value was observed which was much higher than the other in this honey.

From these results, it could be conclude that the vitamin C values obtained for the different honey types are higher for thyme honey than the others, but they have a high standard deviation (SD) that implies a wide distribution of values in this honey type.

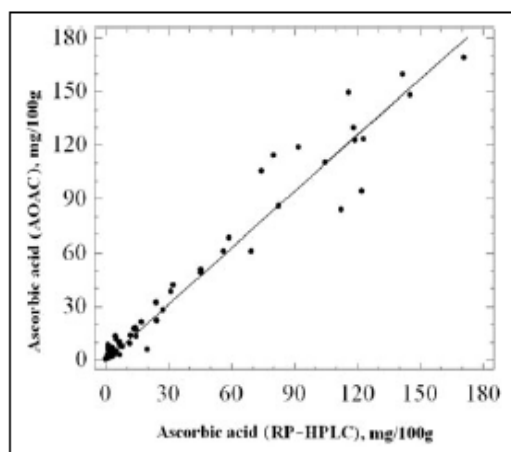


Figure 2—Linear regression between ascorbic acid values in mg/100 g in honey samples by AOAC and RP-HPLC analysis method.

Multivariate discriminant study of different physicochemical variables as markers for honey types

The aim of this study was to look for markers of the different Castilla-La Mancha honey sources, and their characterization based to different physicochemical parameters. Sixty-three honey samples were studied in order to fix these markers with all of them

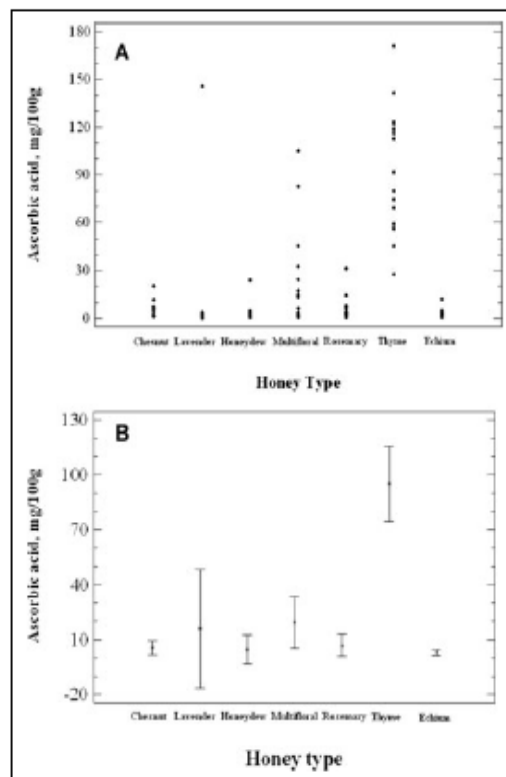


Figure 3—Distribution of ascorbic acid values by RP-HPLC analysis method in mg/100 g in function of unifloral honey floral origin. (A) Obtained values in each honey type and (B) averages and confidence intervals for each honey type.

Table 1—Average values and standard deviation obtained for the physicochemical parameters determined in each unifloral honey studied.

Honey type	Vitamin C						Turbidity	Free acidity	Conductivity	HMF	Moisture	Fructose Glucose		
	mg/100 g	$\alpha \pm 10$	$\beta \pm 10$	Cab ± 10	L ± 10	Hab ± 10		mg/kg	ms/cm	mg/kg	(%)	pH	(%)	(%)
Chestnut (n = 11)	10.66 (5.67)	21.05 (5.85)	59.52 (5.79)	63.37 (6.13)	38.46 (6.51)	71.21 (4.81)	0.41 (0.09)	45.02 (13.78)	1.06 (0.16)	4.64 (2.39)	16.06 (0.88)	4.62 (0.34)	31.67 (1.59)	26.75 (2.01)
Lavender (n = 9)	2.11 (1.08)	4.54 (3.15)	60.39 (13.48)	60.56 (13.59)	78.13 (4.68)	85.81 (2.97)	0.09 (0.05)	23.40 (3.74)	0.30 (0.07)	0.52 (3.27)	15.86 (1.55)	4.21 (0.30)	37.72 (2.85)	29.53 (1.78)
Honeydew (n = 5)	0.77 (9.89)	20.55 (4.84)	75.23 (2.46)	78.02 (2.65)	57.85 (6.25)	74.79 (3.55)	0.18 (0.10)	29.70 (0.57)	0.60 (0.27)	3.22 (4.83)	15.27 (0.36)	4.66 (0.29)	30.35 (2.89)	20.22 (2.10)
Rosemary (n = 11)	5.08 (8.84)	-0.10 (0.80)	17.37 (6.65)	17.37 (6.66)	88.23 (3.93)	90.46 (1.50)	0.07 (0.03)	9.49 (5.13)	0.13 (0.03)	0.67 (3.24)	15.65 (0.70)	4.00 (0.11)	39.08 (5.67)	37.76 (3.63)
Thyme (n = 16)	57.15 (38.77)	8.40 (4.45)	53.04 (14.55)	53.89 (14.88)	72.21 (9.00)	83.59 (3.47)	0.15 (0.10)	26.33 (3.31)	0.41 (0.11)	0.90 (1.80)	15.97 (0.86)	4.50 (0.19)	40.69 (1.31)	32.00 (1.57)
Echinum (n = 12)	2.18 (2.87)	15.61 (10.13)	57.67 (11.79)	60.28 (13.58)	59.29 (13.35)	76.69 (7.20)	0.24 (0.14)	35.67 (14.69)	0.72 (0.30)	0.82 (4.35)	15.84 (0.97)	4.31 (0.33)	36.21 (2.18)	31.38 (3.54)

unifloral type. The 19 multifloral honeys were excluded due to its mixed botanical source. Table 1 shows the average data of these parameters and the SD of the measures realized in each type of honey sample. In addition, the number of samples analyzed in the average for each honey type is indicated in the table.

The experimental data for the physicochemical parameters, except vitamin C, have been contrasted with those available in the literature for Spanish unifloral honeys. In general, the results found are in good agreement with data for rosemary, lavender, and thyme (Mateo and Bosch 1998; Terrab and others 2004; Nozal and others 2005).

An LDA was applied to classify the different honey types. The parameters introduced in the analysis were free acidity, moisture, conductivity, pH, HME, glucose, fructose, and vitamin C. After that the statistical method discriminates between the parameters,

which have influence or not in the classification of the different honey types. The influential parameters could be used as honey markers.

Figure 4 shows the collected values of the discriminant functions obtained for the different honey types. This figure shows a clearly marked honey classification with 2 discriminant functions. These functions have only 4 influential parameters from all physicochemical parameters studied. The final chosen parameters for these functions are sugar content (glucose and fructose), electrical conductivity, and vitamin C content. Table 2 shows the discriminant functions and their auto-values with the significant percentage of each one in the classification of honeys. These discriminant functions are obtained with the quantitative variables that statistically discriminate between honey sources. In this table, it can be observed that the 2 first functions classify 88% of the data measured for the 6 different honeys. Table 3 summarized the standardized coefficients obtained for the 4 quantitative variables in the 2 principal discriminant functions.

Figure 4 shows the obtained values in the 2 main discriminant functions for the 6 honey sources studied. As can be seen in this figure, the classification of honeys in the corresponding source is clearly differentiated and the groups are separated in function of the parameters cited above. In fact, the results obtained for different variables in the honey sources studied have very different influence in the honey classification. Therefore, it is possible to consider the parameters independently, because in some of them a variation in function of honey source was found, but anything can be used to define the botanical source marker. Particularly, vitamin C was clearly higher in the thyme honeys than the others, but the values had a great variability into this honey source. On the other hand, rosemary honeys had higher sugar content than thyme honey and honeydew had the lowest sugar content. The conductivity was also different in each source, and the highest conductivity values corresponded to chestnut honeys and the lower values to rosemary and lavender.

The real classification of the 64 unifloral honey samples, using the discriminant functions obtained in this study is shown in Table 4. The values are percentages corresponding to the number of honeys well classified in relation to the total honeys in each honey source. The percentage of accurate classification (100%) was obtained in the chestnut and honeydew honey, and a high percentage is obtained in lavender (88.9%) and thyme (87.5%). In the case of the other 2 honey types, the majority of cases are assigned to the correct group (rosemary 54.5% and echium 50%) being in both cases a 36.4% in rosemary and 25% in echium assigned to lavender group. This behavior is logical if it is taking into account that the assignment of a specific source to 1 honey corresponds to a minimum percentage of its own pollen and each honey has a mixture of different pollen types. Thus, it can be said that discriminant analysis is a very good tool for the differentiation and classification of Castilla-La Mancha studied honeys.

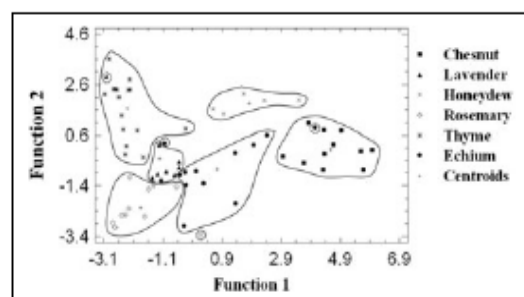


Figure 4—Discriminant functions obtained for discrimination of unifloral honeys from their different botanical origin.

Table 2—Discriminate functions obtained for honey type and percentage of explanation of each one in the variability of data for variables studied. $N = 63$; honey types = 6.

Discriminate function	Eigenvalue	Percentage	Correlation
1	6.7143	67.07	0.9329
2	2.1306	21.28	0.8250
3	1.1114	11.10	0.7255
4	0.0542	0.54	0.2268

Table 3—Standardized coefficients of 2 principal discriminant functions obtained for the different honey types. $N = 64$; honey types = 6.

Function	1	2
Conductivity	0.932841	0.0764852
Fructose	-0.620484	0.393597
Glucose	0.289584	-0.898637
Vitamin C	-0.318158	0.577607

Table 4—Percentage of correct classification data by discrimination functions in each honey type.

Real type	Size	Chestnut	Lavender	Honeydew	Rosemary	Thyme	Echium
Chestnut	11	100.0	—	—	—	—	—
Lavender	9	—	88.9	—	—	11.1	—
Honeydew	5	—	—	100.0	—	—	—
Rosemary	11	—	36.4	—	54.5	—	9.1
Thyme	16	—	12.5	—	—	87.5	—
Echium	11	8.3	25.0	8.3	8.3	—	50.0

Conclusions

Vitamin C analysis in these honeys can be carried out by RP-HPLC isocratic method in 3 min with very good correlation with respect to the official method for juices, AOAC dichloroindophenol method. Vitamin C content, which gives high antioxidant properties to honey is higher in thyme samples than in other honey types, reaching in some cases quantities up to 170 mg/100 g.

In the experimental physicochemical variables measured in Castilla-La Mancha honeys, only electrical conductivity, sugar, and vitamin C content showed a discriminant capacity as markers of the different honey types. Considering vitamin C as a new marker of honey types, this parameter together with conductivity and sugar content have allowed correct classification into 6 honey groups as it was shown in Figure 4.

The assignment of each honey sample to their correct botanical source is highly correct for chestnut, honeydew, lavender, and thyme. For rosemary and echium, the higher percentage of samples is assigned to their correct type.

Acknowledgments

The authors are gratefully acknowledge to "Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha" for financial support with the projects PAI09-0018-9267 and 05-299/IA-47 and to beekeepers for contributing with the samples used in this study and laboratory personal of "Centro Agrario de Marchamalo."

References

- AOAC International. 2005. *Method 967.12*. Official methods of analysis. 18th ed. Gaithersburg, Md.: AOAC Intl.
- Bogdanov S, Ruoff K, Perano Oddo L. 2004. Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review. *Apidologie* 35:54-517.
- Castro RN, Azeredo LC, Azeredo MA, de Sampaio C. 2001. S.T. HPLC assay for determination of ascorbic acid in honey samples. *J Liq Chromatogr & Rel Technol* 24:1015-20.
- Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. 1996. Principales características de la miel de la Alcarria Marchamalo (Guadalajara).
- Corsonetti R, Cagliani LR. 2008. Geographical characterization of polyfloral and acacia honeys by nuclear magnetic resonance and chemometrics. *J Agric Food Chem* 56:6873-80.
- Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001. 2001. Relating to honey. Official Journal of the European Union L31:47-52.
- Council Directive 2006/1924/EC of 20 December 2006. 2006. Nutrition and health claims made on foods. Official Journal of the European Union L404:9-25.
- Council Directive 2008/108/EC of 15 January 2008. 2008. Amending regulation (EC) No 1925/2006 on the addition of vitamins and minerals and of certain other substances to foods. Official Journal of the European Union L39:11-3.
- Devillers J, Morlot M, Pham-Delague MH, Doré JC. 2004. Classification of mono floral honeys based on their quality control data. *Food Chem* 86:3053-312.
- Eitzold E, Lichtenberg-Kraag B. 2008. Determination of the botanical origin of honey by Fourier-transformed infrared spectroscopy: an approach for routine analysis. *Eur Food Res Technol* 227:579-86.
- Ferreira I, Azeu E, Barreira JCM, Esteveiro LM. 2009. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem* 114:1438-43.
- Gheldof N, Wang X, Engstler NJ. 2002. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chem* 50:5870-77.
- González-Minor ML, Terrab A, Hernanz D, Fernández-Racamalo MA, Heredia FJ. 2005. Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and their botanical origin. *J Agric Food Chem* 53:2574-80.
- Güler A, Bakan A, Nispet C, Yavuz O. 2007. Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose. *Food Chem* 105:1119-25.
- Louveau J, Maurizio A, Vorwohl G. 1978. International Commission for Bee Botany of IUBS. Methods of melissopalynology. *Bee World* 59:139-57.
- Marini F, Magri AL, Balestrini F, Fabretti F, Marini D. 2004. Supervised pattern recognition applied to the discrimination of the floral origin of six types of Italian honey samples. *Anal Chim Acta* 515:117-25.
- Mateo R, Bouch F. 1998. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars and pH. *J Agric Food Chem* 46:393-400.
- Mateo R, Jimenez M, Bouch F. 1992. Evaluation of the color of some Spanish unifloral honey types as a characterization parameter. *J AOAC Int* 75:537-42.
- Miller JN, Miller JC. 2000. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. Dorchester, Dorset, England: Prentice Hall. p 120.
- Nozal MJ, Bernal JL, Diego JC, Martín MT. 2005. Classifying honeys from the Soria province of Spain via multivariate analysis. *Anal Bioanal Chem* 382:311-9.
- Pérez-Arquile C, Conchello P, Ariño A, Juan T, Herrera A. 1995. Physicochemical attributes and pollen spectrum of some unifloral Spanish honeys. *Food Chem* 54:167-72.
- Perano-Oddo L, Piro R. 2004. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie* 35:538-581.
- Perano-Oddo L, Piana L, Bogdanov S, Bentabol A, Gotsiou P, Kerkvliet J, Marín P, Morlot M, Ortiz VA, Ruoff K, Von der Ohe K. 2004. Botanical species giving unifloral honey in Europe. *Apidologie* 35:582-593.
- Pisera MG, Perano-Oddo L. 2004. Bibliographical review of the main European unifloral honeys. *Apidologie* 35:594-5111.
- Soria AC, González M, de Lorenzo C, Martínez-Castro I, Sanz J. 2004. Characterization of acacia honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. *Food Chem* 85:121-30.
- Terrab A, Dier MJ, Heredia FJ. 2002. Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chem* 79:373-9.
- Terrab A, González AG, Dier MJ, Heredia FJ. 2003. Mineral content and electrical conductivity of the honeys produced in Northwest Morocco and their contribution to the characterization of unifloral honeys. *J Sci Food Agric* 83:37-43.
- Terrab A, Racamalo AF, Hernanz D, Heredia FJ. 2004. Characterization of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chem* 88:537-42.
- Tomoi-Sato MD, Go-Miyata MD. 2000. The nutraceutical benefits. Part III: honey. *Nutrition* 16:468-9.
- Vázquez-Odieriz ML, Vázquez-Blanco ME, López-Hernández J, Simal-Lozano J, Romero-Rodríguez MA. 1994. Simultaneous determination of organic acids and vitamin C in green beans by liquid chromatography. *J AOAC Int* 77:1056-9.
- Von der Ohe W, Perano-Oddo L, Piana ML, Morlot M, Marín P. 2004. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie* 34:518-525.

CAPÍTULO IV:

Determinación de vitaminas del grupo B en mieles por HPLC en modo isocrático

1. INTRODUCCIÓN

Las vitaminas y minerales, también conocidos como micronutrientes, son utilizados por nuestro cuerpo en pequeñas cantidades para facilitar las reacciones químicas que las células necesitan para vivir. Estos nutrientes pueden afectar a la digestión, sistema nervioso, sistema neurológico y otras funciones del cuerpo.

Las vitaminas son compuestos heterogéneos imprescindibles para la vida, que al ingerirlas de forma equilibrada y en dosis esenciales puede ser trascendental para promover el correcto funcionamiento fisiológico. La gran mayoría de las vitaminas esenciales no pueden ser producidas por el organismo, por lo que éste no puede obtenerlos más que a través de la ingesta equilibrada de las vitaminas contenidas en los alimentos naturales o complementos alimenticios.

Las vitaminas hidrosolubles y liposolubles son de gran importancia para la salud. Se diferencian en que las vitaminas liposolubles se almacenan en el organismo, por lo que su consumo diario no es necesario si hay reserva vitamínica. Por el contrario, las vitaminas hidrosolubles al disolverse en agua se pierden fácilmente, por lo que es necesario un consumo periódico, ya que se puede evitar su consumo sólo por un pequeño periodo de tiempo.

Las vitaminas hidrosolubles son la vitamina C, ya estudiada en el Capítulo III, y las vitaminas hidrosolubles del grupo B:

- **Tiamina o vitamina B₁**: funciona produciendo energía para la regulación del sistema nervioso, lo que interviene en el estado de ánimo y en funciones muy importantes como la regulación cardíaca. Su deficiencia produce Beriberi, enfermedad que trae debilidad muscular y puede ocasionar infartos.

- **Riboflavina o vitamina B₂**: colabora en el metabolismo y la formación de tejidos. Su deficiencia puede traer lesiones en la piel y sensibilidad a la luz.

- **Niacina o vitamina B₃**, que se desglosa en **ácido nicotínico (vitamina B_{3H})** y **nicotinamida (vitamina B_{3N})**: funciona en la vasodilatación que permite mejor circulación de la sangre y mayor producción de hormonas y neurotransmisores indispensables para el cerebro y el sistema nervioso.

- **Ácido pantoténico o vitamina B₅**: colabora en la formación de hormonas anti estrés, en la desintoxicación del organismo y en la metabolización de ácidos grasos.

- **Piridoxina o vitamina B₆**: colabora en la formación de glóbulos rojos y su carencia se identifica con estados de ánimo depresivos y alteraciones en todos los órganos del cuerpo.

- **Biotina o vitamina B₇** (a veces denominada **vitamina B₈**): indispensable en la formación y mantenimiento de la piel y sus componentes, como las glándulas sebáceas. También interviene en el desarrollo de las glándulas sexuales.

- **Ácido fólico o vitamina B₉**: indispensable para la división y multiplicación celular. Su carencia se identifica con menor resistencia a enfermedades, anemia, insomnio y pérdida de la memoria.

- **Cianocobalamina o vitamina B₁₂**: interviene en la síntesis de ADN y ARN. Su carencia se traduce en desórdenes del sistema nervioso y sus componentes, produciendo deficiencias a nivel hormonal, psíquico y físico.

Conocer que vitaminas hidrosolubles del complejo B contiene la miel, así como su concentración, es muy interesante ya que es un alimento natural que puede ser una fuente de vitaminas lo que supone para el mismo un alto valor añadido.

En los años 40 se publicaron los primeros resultados de contenidos vitamínicos en mieles. En estos trabajos, se encontraron cantidades extremadamente variables de las vitaminas, y se concluye que este hecho se debe a la fuente y el número de granos

de polen presentes en la miel. Haydak et al. [1942] demostraron la existencia de tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), piridoxina (vitamina B₆), ácido pantoténico (vitamina B₅) y ácido nicotínico (vitamina B₃H) en mieles de EEUU y de otros lugares del mundo, por métodos microbiológicos y químicos mediante reacciones de valoración y formación de productos de reacción que se miden por espectrofotometría. Las cantidades encontradas en estas mieles por cada 100 g son: tiamina, 5.5 µg; riboflavina, 61.0 µg; piridoxina, 299.0 µg; ácido pantoténico, 105.0 µg y ácido nicotínico, 36 mg.

En estos años, se compararon los contenidos en vitaminas de mieles nuevas (hasta dos años de antigüedad) y mieles antiguas (de 3 a 7 años de antigüedad) [Kitzes et al., 1943]. La disminución en el contenido de ácido pantoténico en las más antiguas, se relaciona con la inestabilidad de esta vitamina en el medio ácido de la miel. Las cantidades de vitaminas encontradas en estas mieles están en el mismo orden de magnitud que los obtenidos por Haydak et al. [1942], aunque para la piridoxina (10 µg/100 g) se obtuvieron niveles inferiores. Los autores consideran que esta diferencia se debe al uso de ensayos químicos cuyo tratamiento de la muestra incrementaba las interferencias, sobreestimando el contenido real de esta vitamina en la miel. En este trabajo también se determina ácido fólico (vitamina B₉) y biotina (vitamina B₇) obteniendo concentraciones muy bajas: 3 µg y 0.066 µg por 100 g de miel, respectivamente. Por otra parte, los autores demostraron que el polen y la jalea real eran una buena fuente de vitaminas del grupo B. En particular la jalea real es muy rica en biotina y ácido pantoténico.

Los métodos de análisis utilizados en esta época son: oxidación química con ferricianuro potásico en medio básico para dar tiocromo (compuesto fluorescente) para el análisis de la tiamina; colorimetría previo tratamiento con el reactivo de Gibbs para la piridoxina; colorimetría previa derivatización con anilina para el ácido nicotínico; y mediante ensayos microbiológicos para el análisis de riboflavina y ácido pantoténico [Haydak et al., 1942; Kitzes et al., 1943].

Actualmente, en la bibliografía se puede encontrar una gran cantidad de métodos analíticos para la determinación de vitaminas hidrosolubles. La técnica más ampliamente utilizada es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), aunque también se han utilizado en numerosas ocasiones métodos microbiológicos,

espectroscópicos, electroquímicos y técnicas de inmunoensayo [Nollet, 2000; Blake, 2007; San Andrés et al., 2010; Bernal et al., 2011]. Nuestro grupo de investigación trabaja desde hace tiempo en este tema, analizando las vitaminas lipó e hidrosolubles en diferentes muestras, por técnicas cromatográficas y de fluorescencia, generalmente en presencia de disoluciones de tensioactivos [García et al., 2001; Ramos-Lledó et al., 2001; Almagro et al., 2002; León-Ruiz et al., 2005; Torre et al., 2008; San Andrés et al., 2011].

A continuación se realiza un resumen exclusivamente de las técnicas cromatográficas que se han utilizado para la identificación y cuantificación de vitaminas hidrosolubles con detección UV-Vis y de fluorescencia, en diferentes matrices. En algunos trabajos, se han añadido disoluciones de tensioactivos a la fase móvil con el fin de modificar la selectividad que se obtiene con fases móviles hidroorgánicas, ya que las estructuras de las diferentes vitaminas difieren entre sí mucho más que otros grupos de compuestos y es difícil separarlas con buena resolución en un tiempo de análisis corto. En los diferentes trabajos encontrados en la bibliografía, se distinguirá por tanto entre técnicas cromatográficas en ausencia y en presencia de disoluciones de tensioactivos. Para finalizar esta introducción, se presentan y comentan los trabajos científicos encontrados para el análisis de vitaminas del complejo B en mieles.

1.1. Métodos cromatográficos para la determinación de vitaminas hidrosolubles del grupo B.

1.1.1. Métodos cromatográficos en ausencia de tensioactivos en la fase móvil

Desde hace tiempo, existe una necesidad de poner a punto métodos cromatográficos rápidos y específicos para el análisis de vitaminas. La determinación de una, así como ciertas combinaciones de dos a más vitaminas, puede realizarse en modo isocrático, sin embargo la separación de varios de estos analitos de muy diferente polaridad, requiere trabajar en modo gradiente. El método cromatográfico puede llevarse a cabo en fase normal, intercambio iónico, pares de iones y lo más común, en fase inversa, RP-HPLC.

El desarrollo de nuevas fases estacionarias permite la separación de las vitaminas mas polares sin la necesidad de añadir un reactivo para la formación de un par iónico. Así, el uso de una fase estacionaria, para compuestos básicos, con grupos amida (RP-Amide C₁₆) proporciona una buena separación de varias vitaminas del grupo B [Viñas et al., 2001; 2003].

Varias técnicas de detección pueden ser aplicadas en el análisis de vitaminas, sin embargo la detección UV-Vis es la más generalizada, sin olvidar la detección por fluorescencia para aquellas vitaminas que posean fluorescencia nativa o después de una reacción química de derivatización [Jedlička & Klimeš, 2005; Blake, 2007]. Hoy en día el acoplamiento con masas, LC-MS, se utiliza cada vez mas y en gran medida en presencia de matrices complejas [Bernal et al, 2011; Di Stefano et al., 2012].

Una etapa clave es la preparación de la muestra para el análisis. Hay que distinguir el tipo de muestra, fármacos, alimentos, fluidos biológicos, etc, y en función de su complejidad así serán de complejos los métodos de extracción de las vitaminas. En los alimentos, por ejemplo, se distinguen dos enfoques:

- A. Extracción de las cantidades añadidas de vitaminas (*fortified levels*).
- B. Extracción de la cantidad total de vitaminas, añadidas y endógenas. Este enfoque es el recomendado por la Unión Europea.

En el primer caso, en bebidas o formulaciones infantiles, suele bastar con tratar la muestra con ácido perclórico o ácido tricloroacético, centrifugar y filtrar. Sin embargo, para matrices complejas el procedimiento es más lento y comprende generalmente, una hidrólisis ácida seguida de una hidrólisis enzimática, y extracción en fase sólida. Además es fundamental realizar un estudio de todas y cada una de las variables que intervienen en el proceso, ácido y enzima a emplear, temperatura, pH, sorbentes, tiempo, etc. lo que hace que el método sea complejo además de lento [Blake, 2007].

La tabla IV.I resume las principales características de los métodos cromatográficos empleados en la determinación de vitaminas hidrosolubles del grupo B, en ausencia de tensioactivos.

Tabla IV.1. Determinación de vitaminas hidrosolubles del grupo B por HPLC en ausencia de tensioactivos

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q)	MUESTRA	REF.
B ₁ B ₂ B ₃ N B ₆ B ₉ B ₁₂	Spherisorb ODS2 C18, 5 µm, 250x4.6 mm	ISOCRÁTICO MeOH-agua (15:85), ácido octanosulfónico 5 mM, trietilamina 0.5% pH 3.6	UV a diferentes λ	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 55 min. T ambiente	0.02-0.10 µg/ml	Leche infantil	Albalá et al., 1997
<i>Tratamiento de muestra:</i> Precipitación de las proteínas por adición de TCA, centrifugación.							
B ₆ Otros vitámeros	Phenosphere ODS2, 5 µm, 250x4.6 mm	ISOCRÁTICO NaH ₂ PO ₄ 0.15 M pH=2.5 con HClO ₄	FL 290/389 nm	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 20 min T ambiente	----	Levaduras Huevos Leche	Argoudelis, 1997
<i>Tratamiento de muestra:</i> Adición de ácido perclórico, mezclar, centrifugar y ajustar pH. Filtración							
B ₆ Otros vitámeros	Spherisorb C18, 5 µm, 250x4.6 mm	ISOCRÁTICO H ₂ SO ₄ 0.01 M	FL 290/395 nm	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 10 min T=30 °C	----	Carne de cerdo y embutidos	Esteve et al., 1998
<i>Tratamiento de muestra:</i> Extracción con HCl 0.1 M a 100 °C durante 30 min, enfriar, ajustar pH entre 4.0 y 4.5. Hidrólisis enzimática, 3 h a 45 °C, calentar, enfriar y filtrar.							
B ₂ Otros vitámeros	Hypersil C18, 5 µm, 200x2.1 mm	GRADIENTE A = tampón fosfato pH 3.0 B = ACN 0 min: 95 % A, 5 % B 8 min: 75 % A, 25 % B 12 min: 95 % A, 5 % B	FL 265/525 nm	Flujo = 0.6 mL/min t _{salida} = 8 min	0.49 mg/mL	Vino Cerveza Zumos de frutas	Andrés-Lacueva et al., 1998
<i>Tratamiento de muestra:</i> Ninguno							

Tabla IV.1. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q)	MUESTRA	REF.
B ₉	Microsorb-MV C18, 3 µm, 100x4,6 mm	ISOCRÁTICO A = tampón fosfato pH=6.8, con 0.005 M dihidrogenofosfato de tetrabutilamonio B = MeOH 75 % A, 25 % B	UV 280 nm	Flujo = 1 mL/min t _{análisis} = 13 min T ambiente	2 ng	Cereales fortificados	Osseyi et al., 1998
<p><i>Tratamiento de muestra:</i> La muestra se agita durante 1 h en K₂HPO₄ 0.1 M (pH 8—9) que contiene un 0.05 % de ascorbato, se ajusta el pH a 6.9 con ácido fosfórico. Se añade a-amilasa incubando durante 1h at 65 °C. Se enfría, se centrifuga y se filtra. Si es necesario se realiza una etapa de <i>clean-up</i> con cartuchos SAX.</p>							
C B ₁ B ₂ B ₃ N B ₆	Supelcosil LC-8-DB, 5 µm, 250x4,6 mm	ISOCRÁTICO A = Hexanosulfonato de sodio y trietanolamina en agua, pH=2.8 B = MeOH 85 % A, 15 % B GRADIENTE A = Hexanosulfonato de sodio y trietanolamina en agua, pH=2.8 B = MeOH 0 min: 92 % A, 8 % B 10min: 82.8% A, 17.2% B	UV 280 nm	Flujo=2 mL/min t _{análisis} ≈ 30 min. T ambiente	0.01 mg/mL 0.06 mg/mL 0.025 mg/mL 0.05 mg/mL 0.02 mg/mL	Productos farmacéuticos	Ivanovic et al., 1999
<p><i>Tratamiento de muestra:</i> Disolución en 0.01M HCl, ultrasonidos y centrifugación</p>							

Tabla IV.1. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q)	MUESTRA	REF.
B ₁ B ₂ B ₃ N B ₆ B ₁₂	Nova-Pack C18, 4 µm, 150×3.9 mm	GRADIENTE A = CH ₃ COONH ₄ 0.05M B = MeOH 0-1.5 min: 92.5 % A, 7.5 % B 1.6 min:84 % A, 16 % B 15 min:70 % A, 30 % B	UV 280 nm 362 nm (B ₁₂)	Flujo=2 mL/min t _{salida} = 15 min. T ambiente	3.18 mg/L 1.84 mg/L 9.92 mg/L 1.37 mg/L 0.04 mg/L	Productos farmacéuticos	Moreno&Salvado, 2000
Tratamiento de muestra: Dilución de la muestra en agua, extracción en un cartucho C18 en medio acuoso.							
B ₁ B ₆	Nucleosil C18, 5 µm, 250×4.6 mm	ISOCRÁTICO A = (NH ₄) ₂ CO ₃ , 0.1 M B = agua C = MeOH 5 % A, 15 % B, 80 % C	UV 254 nm	Flujo=1.5 mL/min t _{salida} = 4 min. T ambiente	----	Productos farmacéuticos	Dinçet al., 2000
Tratamiento de muestra: Extracción con MeOH							
B ₁₂	Fase estacionaria fenilpropanolamina 5 µm, 150×4.6 mm	ISOCRÁTICO A = tampón fosfato, 30mM, pH 3.0 B = ACN 94 % A, 6 % B	UV 361 nm	Flujo=1 mL/min t _{salida} = 6 min.	25 ng	Productos farmacéuticos	Wongyai, 2000
Tratamiento de muestra: Extracción con MeOH							
B ₉	Ultrasphere ODS, 5 µm, 250×4.6 mm	ISOCRÁTICO A = KH ₂ PO ₄ , 0.03 M pH= 2.2 con H ₃ PO ₄ B = MeOH 78 % A, 22 % B	UV 280 nm	Flujo=1 mL/min t _{salida} = 13 min. T=22°C	0.05 µg/mL	Productos farmacéuticos	Kall et al., 2000
Tratamiento de muestra: Extracción con tampón acético/acetato a pH=6, autoclave, enfriar, diluir, centrifugar y filtrar.							
B ₁₂	µBondapak C18, 10 µm, 300×3.9mm	ISOCRÁTICO A = agua B = MeOH 70 % A, 30 % B	FL 275/305 nm	Flujo=1 mL/min t _{salida} = 5 min. T ambiente	0.1 ng/mL	Productos farmacéuticos	Liet al., 2000
Tratamiento de muestra: Extracción con un tampón KH ₂ PO ₄ 0.1 M ajustado a pH=7.0.							

Tabla IV.1. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q.)	MUESTRA	REF.
B ₅	Luna C8, 5 µm, 50×4.6 mm	ISOCRÁTICO A = KH ₂ PO ₄ 0.1 M pH=2.25 con H ₃ PO ₄ B = ACN 97% A, 3 % B	UV 200, 205, 204 nm	Flujo=1.4-1.8 mL/min t _{salida} = 16 min. T ambiente	0.3 mg/100 g	Leche infantil	Woollard et al., 2000
<i>Tratamiento de muestra:</i> Dilución de la muestra con agua, esperar 20 min., adicionar ácido acético, centrifugar y filtrar.							
B ₂	Hypersil ODS C18, 5 µm, 200×2.1 mm	GRADIENTE A = NaH ₂ PO ₄ 0.05 M pH=3.0 con H ₃ PO ₄ B = ACN 0 min: 95 % A, 5 % B 8 min: 75 % A, 25 % B 12 min: 95 % A, 5 % B	FL 265/525 nm	Flujo=0.6 mL/min t _{salida} = 12 min. T ambiente	----	Vinos blancos	Mattivi et al., 2000
<i>Tratamiento de muestra:</i> Ninguno							
B ₂ Otros vitámeros	Alphabond C18, 10µm, 300×4.6 mm Symmetry C18, 5µm, 150×3.9 mm	GRADIENTE A = MeOH B = acetato de amonio 0.05 M, pH=6.0 0 min: 30 % A, 70 % B 1 min: 30 % A, 70 % B 10 min: 70 % A, 30 % B	FL 450/530 nm	Flujo=1 mL/min t _{salida} = 15 min.	1.0 ng/mL	Huevos, leche, productos lácteos e hígado	Gliszczynska- Swiglo & Koziolowa, 2000
<i>Tratamiento de muestra:</i> La muestra se suspende en una mezcla de MeOH/CH ₂ Cl ₂ (9:10), agitar durante 60 s, se adiciona (NH ₄)HCO ₃ 0.1 M, se agita durante 60 s, se centrifuga y se filtra.							
C B ₁ B ₂ B ₆	µBondapak C18, 5 µm, 250×4.6 mm	GRADIENTE A = TFA 0.1 M B = TFA 0.1 M / MeOH 10 : 90 5 min: 99.5 % A, 0.5 % B 12 min: 10 % A, 90 % B 15 min: 10 % A, 90 % B	UV 254 nm	Flujo=1 mL/min t _{salida} = 13 min. T ambiente	0.42 µg/mL 1.80 µg/mL 0.22 µg/mL 6.7 µg/mL	Orina	Cho et al., 2000
<i>Tratamiento de muestra:</i> La muestra se extrae con un cartucho C18 y se eluye en medio ácido (pH=4.2; con HCl 0.005 M) y posteriormente con MeOH, se evapora y el residuo se disuelve en un medio ácido (pH=3.7).							

Tabla IV.1. (continuación)

VITAMINAS	COLUMINA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q)	MUESTRA	REF.
B ₁ Pirafosfato de tiarina Monofosfato de tiarina Tiamina	Spherisorb ODS-2, 5 µm, 150×4.0 mm	GRADIENTE A = 1 % ácido acético y 0.1 % pentasulfonato de sodio B = 1 % ácido acético y 0.1 % pentasulfonato de sodio y 50 % ACN 0 min: 88 % A, 12 % B 7 min: 88 % A, 12 % B 8 min: 40 % A, 60 % of B 13 min: 40 % A, 60 % B 14 min: 88 % A, 12 % B	UV 230,250,264 nm	Flujo=1 mL/min t _{salida} = 25 min. T ambiente	0.02 µg/mL 0.2 µg/mL 0.03 µg/mL	Productos farmacéuticos	Viñas et al., 2001
		A = KH ₂ PO ₄ 25 mM, B = ACN 0 min: 100 % A 10 min: 100 % A, 10 % B 20 min: 100 % A, 10 % B 21 min: 100 % A					
Tratamiento de muestra: Extracción con agua							
B ₉	Eurospheer 100 C18, 5 µm, 250×4.6 mm	GRADIENTE Hidrógeno sulfato de tetraetilamonio 5 mM/ NaCl 25 mM A: en agua B: en ACN 65% 0 min: 90 % A, 10 % B 10 min: 90 % A, 10 % B 15 min: 64 % A, 36 % B 35 min: 50 % A, 50 % B 38 min: 50 % A, 50 % B	UV 284 nm	Flujo=0.6 mL/min t _{salida} = 20 min. T= 25 °C	0.06 mg/L	Zumos de frutas	Breithaupt, 2001
Tratamiento de muestra: Centrifugación seguida de filtración y clean-up en cartuchos SAX. Elución con acetato de sodio 0.1 M							

Tabla IV.1. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.O)	MUESTRA	REF.
C B ₁ B ₂ B ₃ B ₆	BDC C18 250x4.6 mm	ISOCRÁTICO Agua/MeOH (73 : 26) en presencia de ácido acético	DAD 280 nm	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 25 min T ambiente	----	Productos farmacéuticos	Zbanysek & Buszewski, 2002
<i>Tratamiento de muestra:</i> La muestra se prepara en la fase móvil, se agita durante 15 min. A 70 °C.							
B ₁ B ₆ B ₁₂	Hypersil-BDS C ₁₈ 3µm, 100x4.6 mm	GRADIENTE A= trietanolamina 0.015% pH=2.7 B= ACN 0 min: 100 % A 3 min.: 75% A; 25% B	UV 280 nm 350 nm (B ₁₂)	Flujo = 1.5 mL/min t _{salida} = 15 min T ambiente	0.014 mg/L 0.005 mg/L 0.006 mg/L	Productos farmacéuticos	Markopoulou et al., 2002
<i>Tratamiento de muestra:</i> La muestra se disuelve en agua, se agita durante 40 min y se aplica ultrasonidos. Filtrar.							
B ₁ B ₂ B ₃ N B ₆	Hypersil C18, 5µm, 150x2.1 mm	ISOCRÁTICO MeOH/ácido acético (18:82) pH=2.8	UV 280 nm	Flujo = 1.2 mL/min t _{salida} = 17 min T=30 °C	----	Productos farmacéuticos	Li, 2002
<i>Tratamiento de muestra:</i> La muestra se disuelve en tiosulfato de sodio a 65 °C durante 15 min. Filtrar.							
B ₁ B ₂ B ₃ H B ₃ N B ₅ B ₆ B ₁₂	Nucleosil C18, 5µm, 2x75 mm	GRADIENTE A = LiClO ₄ 0.4 M pH= 2.4 B = ACN 8 min: 2 % B 17 min: 5-18 % B	UV a diferentes λ	Flujo = 100 µL/min t _{salida} = 25 min T=35 °C	0.49 mg/L	Productos farmacéuticos	Kozhanova et al., 2002
<i>Tratamiento de muestra:</i> Las muestras se disuelven en la fase móvil A/B (19:1), se agita 10 min.							

Tabla IV.1. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.O.)	MUESTRA	REF.
B ₁ B ₂ B ₃ H B ₃ N B ₆ B ₉	LiChrospher60 RP-select B, 250x4,6 mm	ISOCRÁTICO A = tampón fosfato pH=2.8 B = MeOH 80% A, 20% B	UV 264, 280, 245 nm	Flujo=1mL/min t _{salida} = 25 min. T = 30 °C	100 ng/L 25 ng/L 50 ng/L 50 ng/L 25 ng/L	Productos farmacéuticos	Höller et al., 2003
<i>Tratamiento de muestra:</i> Extracción con una mezcla de agua/ACN/ácido acético (94 : 5 : 1). El ácido fólico se extrae con NH ₄ OH 0.3 %							
B ₁ B ₂ B ₃ H B ₃ N B ₆ B ₉ B ₁₂	Supelco RP-Amide C16, 5 µm	GRADIENTE A = KH ₂ PO ₄ 10 mM pH = 6 B = ACN 0 min: 100 % A 13 min: 100 % A 14 min: 94 % A, 6 % B 20 min: 94 % A, 6 % B 21 min: 88 % A, 12 % B 31 min: 88 % A, 12 % B	UV a diferentes λ	Flujo=1 mL/min t _{salida} = 30 min.	0.032 µg/mL 0.010 µg/mL 0.064 µg/mL 0.128 µg/mL 0.068 µg/mL 0.015 µg/mL 0.032 µg/mL	Alimentos infantiles	Víñas et al., 2003
<i>Tratamiento de muestra:</i> Tratamiento con HClO ₄ 1M, calentar 30 min a 90 °C, enfriar y ajustar a pH= 4 con acetato de sodio 1M. Se añade takadiastasa agitando durante 2 h a 50 °C. Se añade ácido tricloroacético calentando durante 10 min a 90 °C. Después de enfriar se diluye con la fase móvil, se centrifuga y se filtra.							
B ₉	Luna C18, 5 µm, 150x2.0 mm	ISOCRÁTICO A = MeOH B = tampón fosfato 0.01M pH=5.0 con hidrogenosulfato de tetraetilamonio 4mM 23% A, 77 % B	UV 270 nm	Flujo=0.3 mL/min t _{salida} = 13 min.	0.02 µg/mL	Micelas	Andrisano, 2003
<i>Tratamiento de muestra:</i> La micelas se disuelven en un 10 % de NH ₄ OH y se diluyen con la fase móvil. El analito se extrae con cartuchos SAX eluyendo con una mezcla de ACN/NaH ₂ PO ₄ 0.1 M.							

Tabla IV.1. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q)	MUESTRA	REF.
C							
B ₁ B ₂ B ₃ H B ₅ B ₆ B ₁₂	Fase estacionaria: CAB ₅ , 5µm, 150x4.6mm	ISOCRÁTICO A=tampón fosfato pH=4 B = MeOH 75 % A, 25 % B	UV 254 nm	Flujo=0.8 mL/min t _{análisis} = 20 min. T=30 °C	----	----	Li et al., 2004
<i>Tratamiento de muestra: ----</i>							
B₁ B₂ B₃H B₃N B₆ B₉ B₁₂							
	Luna C18, 5µm, 150x4.6mm	GRADIENTE A=ácido acético 0.05 M /MeOH (99:1) B = agua/ MeOH (50:50) 0 min: 100 % A 4 min: 100 % B 18 min: 100 % B	DAD 280 nm	Flujo=0.8 mL/min t _{análisis} = 30 min. T ambiente	0.17 ng/mL 0.17 ng/mL 0.17 ng/mL 0.17 ng/mL 0.08 ng/mL 0.08 ng/mL 0.08 ng/mL	Productos farmacéuticos Suero Orina	Chatzimichalakis et al., 2004
<i>Tratamiento de muestra:</i> Los productos farmacéuticos se preparan en agua. Las muestras biológicas se mezclan con ACN, se centrifugan durante 15 min, 4000rpm y se evapora el disolvente. A continuación se realiza una etapa de extracción en fase sólida y se eluye con MeOH/agua, 85:15.							
C							
B ₁ B ₂ B ₃ H B ₃ N B ₅ B ₆ B ₉ B ₁₂	Polaris C ₁₈ -A 3µm, 150x 4.6mm	GRADIENTE A=ácido trifluoacético 0.01% pH=3.9 B=ACN 4min: 95%A:5%B 10min: 2%A:98%B 20min: 95%A:5%B	UV 280 nm	Flujo=0.7 mL/min t _{análisis} = 20 min. T=20 °C	25.55 ng/mL 12.18 ng/mL 188.0 ng/mL 16.41 ng/mL 35.40 ng/mL 865.4 ng/mL 21.17 ng/mL 30.48 ng/mL 97.47 ng/mL	Productos farmacéuticos Lácteos Bebidas dietéticas	Klejdl et al., 2004
<i>Tratamiento de muestra:</i> Puesta en disolución en 50:50 MeOH/ 0.01%TFA. Agitación, centrifugación, evaporación del disolvente y redisolución en 1mL de la misma solución.							

Tabla IV.1. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.O)	MUESTRA	REF.
C B ₁ B ₂ B ₃ N B ₅ B ₆ B ₇ B ₉ B ₁₂	PackPro C18 5 µm, 250x4.6 mm	GRADIENTE A=TFA 0.025% pH= 2.6 B = ACN 5 min: 100 % A 5-11 min.: 25 %B, 75%A 11-20 min.: 40 %B, 60%A	UV 210, 275 nm	Flujo = 0.8 mL/min t _{naie} = 18 min T ambiente	----	Productos farmacéuticos	Heudi et al., 2005
<i>Tratamiento de muestra:</i> La muestra se disuelve en NaOH 2 M, se agita y se añade tampón fosfato y se filtra.							
B ₂ B ₆ Vitámeros de B ₆	Luna C8, 5 µm, 250x3.0 mm	GRADIENTE A= pentanosulfonato sódico 10 mM y ácido acético 1% pH=2.7 B= MeOH/THF (98:2) 0 min: 98%A, 2% B 28 min.: 82%A, 18% B	FL 370/524 nm (B ₂) 295/400 nm (B ₆)	Flujo = 0.4 mL/min t _{naie} = 55 min T=32°C	15 fmol 22 fmol	Productos farmacéuticos Lácteos	Gatti&Gioia, 2005
<i>Tratamiento de muestra:</i> Los lácteos se someten a una digestión ácida con TFA, se centrifuga y una alícuota se diluye con la fase móvil. Los diferentes fármacos se disuelven en agua. Filtrar.							
B ₁ B ₆ B ₁₂	Supelco C18, 5 µm, 250x4.6 mm	ISOCRÁTICO MeOH, 10%/tampón fosfato, 0.05 M pH=3.55 con trimetilamina	DAD 280 nm (B ₁) Electroquímica 0.85 V (B ₆ , B ₁₂)	Flujo = 1 mL/min t _{naie} = 18 min T=22°C	9.2 ng/mL 2.7 ng/mL 0.08 ng/mL	Productos farmacéuticos	Marszall et al., 2005
<i>Tratamiento de muestra:</i> La muestra se disuelve en agua, se mezcla y se deja reposar 40 min. Filtrar.							

Tabla IV.1. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q)	MUESTRA	REF.
B ₁	Spherisorb ODS2 5µm, 250x4.6 mm	ISOCRÁTICO MeOH/tampon acetato, (40:60) pH=8.5	FL 375/440 nm	Flujo = 1 mL/min t _{análisis} =7 min T=35 °C	1.10 ⁻¹⁰ M	Algas Agua marina	He et al., 2005
<i>Tratamiento de muestra:</i> La muestra se filtra y se somete a un proceso de extracción en fase sólida (Sep Pak C18). Se eluye con MeOH y se evapora el disolvente. El residuo se disuelve en HCl y se centrifuga. El sobrenadante se somete a una reacción de derivatización para convertir la tiamina en un producto fluorescente.							
C B ₁ B ₂ B ₃ B ₅ B ₆ B ₉	Discovery C18 5µm, 150x4.6 mm	ISOCRÁTICO tampon fosfato/MeOH (10:90) pH=7	DAD a diferentes λ	Flujo = 0.7 mL/min t _{análisis} = 35 min T=35 °C	0.1 mg/L 0.5 mg/L 0.2 mg/L 0.1 mg/L 0.5 mg/L 0.1 mg/L 0.1 mg/L	Tarhana (alimento turco)	Ekinci&Kadakal, 2005
<i>Tratamiento de muestra:</i> Las muestras se homogenizan y se centrifugan. A continuación se somete a una extracción en fase sólida (Sep-Pak C18). Se eluye con MeOH / agua acetato (50:50). El residuo se disuelve en la fase móvil y se filtra.							
C B ₁ B ₂ B ₃ B ₅ B ₆ B ₉ B ₁₂	Spherisorb ODS2 3µm, 250x4.6 mm	GRADIENTE A=tampon fosfato pH=2.7 B= MeOH 0 min.: 99.4%A, 0.6% B 4 min.: 94%A, 6% B 12 min.: 70%A, 30% B 17 min.: 60%A, 40% B	UV a diferentes λ FL 400/520 nm (B ₂) 290/410 nm (B ₆)	Flujo = 1 mL/min t _{análisis} = 30 min T=40 °C	(2.49 mg/Kg 0.06 mg/Kg 0.01 mg/Kg 0.03 mg/Kg 0.05 mg/Kg 0.11 mg/Kg 0.04 mg/Kg 0.04 mg/Kg)	Lácteos Alimentos infantiles CRM 421 (BCR)	Zafra-Gómez et al., 2006
<i>Tratamiento de muestra:</i> Se añade a las muestras agua, 40 °C, se agitan durante 1 min. y de someten a ultrasónicos durante 5 min. A continuación se guardan durante 1 h en la oscuridad. Centrifugación y el sobrenadante se filtra.							

Tabla IV.1. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q)	MUESTRA	REF.
B ₉	Symmetry C18 5µm, 150x4,6 mm	GRADIENTE A=MeOH B=acetato de amonio, 8 mM 0 min.: 9% A, 91% B 6 min.: 50% A, 50% B	DAD 360 nm	Flujo = 1 mL/min t _{naile} = 11 min T=30 °C	(> 0.1 mg/L)	Lácteos Zumos Bebidas isotónicas	Pérez-Prieto et al., 2006
<i>Tratamiento de muestra:</i> Extracción en fase sólida (Sep-Pak C18). Se eluye con MeOH / tampón acetato (50:50), pH=4. Agitación.							
B ₁ B ₂	Intersil ODS2, 5µm, 200x3mm	ISOCRÁTICO MeOH/agua (80:20) MeOH/agua (40:60)	FL 366/434 nm FL 450/510 nm	Flujo = 0.3 mL/min t _{naile} = 4 min Flujo = 0.4 mL/min t _{naile} = 6 min	----	Muestras de carne e hígado de cerdo	Tang et al., 2006
<i>Tratamiento de muestra:</i> La muestra se somete a una digestión ácida con HCl 0.1 M durante 15 min. a 100 °C, se enfrían y se centrifugan a 9000 rpm. Se ajusta el pH entre 4, 3-4, 7 y se someten a una digestión enzimática en presencia de TCA. Filtrar.							
B ₁ B ₂ B ₃ N B ₅ B ₆ B ₇ B ₉	Hydro-RP C ₁₈ 4µm, 250x2mm	GRADIENTE A=ácido fórmico 0.1% en agua B=ácido fórmico 0.1% en ACN 0 min.: 100% A 5 min.: 50% A, 50% B 15 min.: 5% A, 95% B	DAD(MS) 260 nm 270 nm 260 nm (MS) 292 nm (MS) 280 nm	Flujo = 0.25 mL/min t _{naile} = 25 min	0.5 ng/µL 0.1 ng/µL 0.5 ng/µL 0.02 ng/µL (MS) 0.5 ng/µL 0.02 ng/µL (MS) 0.2 ng/µL	Suplementos vitamínicos y minerales	Chen & Wolf, 2007 Chen et al., 2009
<i>Tratamiento de muestra:</i> La muestra se disuelve en tampón fosfato, pH=2.5, y se somete a ultrasonidos en la oscuridad durante 20 min. Se centrifuga y se filtra.							

Tabla IV.1. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q.)	MUESTRA	REF.
GRADIENTE							
C		A= sal sódica del ácido hexano-1-sulfónico en 0.1%(p/v) de H ₃ PO ₄	DAD 210 nm (C, B ₅ , B ₆) 280 nm (C, B ₁ , B ₂ , B ₃)	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 40 min T ambiente	0.4 µg/mL 0.1 µg/mL 0.2 µg/mL 0.2 µg/mL 0.7 µg/mL 0.1 µg/mL	Productos farmacéuticos	Vidović et al., 2008
B ₁		pH 2.4-2.5					
B ₂	Zorbax SB-Aq C18	B= ACN					
B ₃ N	5 µm, 250x4.6mm	0 min.: 100% A					
B ₅		15 min.: 85% A, 15% B					
B ₆		35 min.: 70% A, 30% B					
Tratamiento de muestra: La muestra, jarabe, se diluye en 0.1%(p/v) de H ₃ PO ₄							
GRADIENTE							
B ₂		A= MeOH			0.57 µg/g		
B ₆		B= tampón fosfato	UV	Flujo = 1 mL/min	3 µg/g	Preparados vitamínicos	Perveen et al., 2009
B ₉	Discovery C18	pH= 4.2	254 nm	t _{salida} = 15 min	10 µg/g		
B ₁₂	5 µm, 250x4.6 mm	lineal en 8 min. hasta 30:70		T ambiente	8 µg/g		
Tratamiento de muestra: La muestra se somete a una digestión ácida con HCl 0.1 M durante 15 min., se enfría y se centrifuga a 1400 rpm. Filtrar.							
GRADIENTE							
C		A= H ₃ PO ₄ 0.6%			0.03 mg/L		
B ₁		pH= 1.7			0.01 mg/L		
B ₂		B= ACN			0.005 mg/L		
B ₃ H		0 min.: 100% A			0.2 mg/L		
B ₃ N	Luna C18,	15 min.: 82% A, 18% B	DAD	Flujo = 0.8 mL/min	0.03 mg/L	Suplementos vitamínicos	Bendryshev et al., 2010
B ₅	5 µm, 150x4.6 mm	15 min.: 50% A, 50% B	a diferentes λ	t _{salida} = 35 min T= 20 °C	0.2 mg/L		
B ₆					0.02 mg/L		
B ₇					0.2 mg/L		
B ₉					0.006 mg/L		
B ₁₂					0.2 mg/L		
Tratamiento de muestra: La muestra se disuelve en H ₃ PO ₄ 1%.							

Tabla IV.1. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q)	MUESTRA	REF.
C B ₁ B ₂ B ₃ H B ₃ H B ₃ N B ₆	Supelco C18, 5µm, 250x4.6 mm	GRADIENTE A=tampón fosfato/ACN 4%/ heptanosulfonato de sodio 10.5 mM pH 2.5 B=ACN 0 min.: 93% A, 7% B 9 min.: 82% A, 18% B 17 min.: 50% A, 50% B	UV 260 nm	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 20 min T ambiente	----	Productos farmacéuticos Suplementos vitamínicos	Rudenko&Kartsov a, 2010
Tratamiento de muestra: La muestra se somete a una digestión ácida con HCl 0.1 M durante 10 min., se enfría y se centrifuga a 8000 rpm. Clean-up con Sep-Pak C18 eluyendo con MeOH.							
B ₁ B ₂ B ₃ B ₆ B ₁₂	Zorbax Eclipse plus C18, 5µm, 250x4.6 mm	ISOCRÁTICO A=MeOH B=H ₃ PO ₄ , 0.023 M pH=3.54 (33:67)	UV 270 nm	Flujo = 0.5 mL/min t _{salida} = 22 min T ambiente	----	Frutas (granadas de R.P. China y Turquía)	Elfalleh et al., 2011
Tratamiento de muestra: Tratamiento con H ₂ SO ₄ 0.1 M, calentar 30 min a 121 °C, enfriar y ajustar a pH= 4.5 con acetato de sodio 1M. Se añade takadiastasa a 35 °C y se deja toda la noche. Filtrar.							
C B ₁ B ₂ B ₃ H B ₃ N B ₆	Discovery RP Amide C16, 5µm, 250x4.6 mm	GRADIENTE A=tampón fosfato pH=2.3 B=ACN 0 min.: 99.8% A, 0.2% B 5 min.: 30% A, 70% B	DAD a diferentes λ	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 15 min T= 35 °C	----	Productos farmacéuticos	Garmonov et al., 2011
Tratamiento de muestra: La muestra se disuelve en agua, se someten a ultrasónicos 5 min. y se filtra.							

Tabla IV.1. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q)	MUESTRA	REF.
B ₂ Otros vitámeros	Zorbax Stable Bond C18, 1.8µm, 50x3 mm	ISOCRÁTICO A=tampón fosfato/MeOH (75:25) pH 2.5 (B=MeOH 0 min: 50% B para quitar impurezas no polares) 4 min.: 100%A	FL 450/520 nm	t _{salida} = 7 min T = 25 °C	0.5 nmol/L	Plasma sanguíneo	Petteys & Frank, 2011
<i>Tratamiento de muestra:</i> La muestra se centrifuga y se congela de manera inmediata. Se añade TCA (15% p/v) para precipitar las proteínas. Se agita y se incuba durante 20 min. y se filtra.							
B ₁ B ₂ Otros vitámeros	Pursuit C18, 5µm, 250x4.6 mm	GRADIENTE A=tampón fosfato pH=6.5 B=MeOH 0-0.5 min: 95% A, 5% B 0.5-15 min.: 65%A, 35% B	FL 360/425 nm 270/516 nm	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 25 min T ambiente	2.0 ng/mL 2.0 ng/mL	Cerveza	Hucker et al., 2011
<i>Tratamiento de muestra:</i> Las muestras son desgasificadas y filtradas. Para la determinación de tiamina ésta se convierte en tiocromo.							
B ₁ B ₂	Purospher C18, 5µm, 250x4 mm	ISOCRÁTICO MeOH/agua (25:75) Heptanosulfonado de sodio 2.5 mM Acetato de sodio 12.5 mM pH 4.2	UV 268 nm	Flujo = 0.9 mL/min t _{salida} = 20 min T ambiente	0.628 mg/100g 0.219 mg/100g	Cereales	San Jose et al., 2012
<i>Tratamiento de muestra:</i> La muestra se somete a una hidrólisis ácida con H ₂ O ₂ 0.1 M a 150 °C durante 30 min. A continuación una hidrólisis enzimática con diastasa/α-amilasa seguida de incubación durante 18 h a 37 °C.							

Tabla IV.1. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q.)	MUESTRA	REF.
C B ₁ B ₂ B ₃ N B ₅ B ₆ B ₉	Altima C18, 5µm, 250x4,6 mm	ISOCRÁTICO tampon fosfato/ACN pH 3.0 95:5 C, B ₁ , B ₃ N, B ₅ y B ₆ 85:15 B ₂ , B ₉	DAD a diferentes l	Flujo = 0.5 mL/min t _{análisis} = 25 min T ambiente	0.137 mg/L 0.041 mg/L 0.026 mg/L 0.143 mg/L 0.181 mg/L 0.042 mg/L 0.010 mg/L	Productos farmacéuticos	Jin et al., 2012
Tratamiento de muestra: La muestra se diluye en presencia de H ₃ PO ₄ 0.05%/tiosulfato de sodio 0.3% p/v, para el análisis de las vitaminas C, B ₁ , B ₃ N, B ₅ y B ₆ , y en NH ₄ OH 0.5% para las vitaminas B ₂ y B ₉ . Filtrar.							
B ₁₂	Zorbax SB-Aq 5µm, 150x4,6 mm	GRADIENTE A=tampon fosfato pH 5.0 B=MeOH 0 min: 90% A, 10% B 0.5-10 min.: 10%A, 90%B	UV 360 nm	Flujo = 1 mL/min t _{análisis} = 20 min T= 25 °C	90 ng/mL	Orina	Berton et al., 2012
Tratamiento de muestra: La muestra se extrae en un líquido iónico hidrofílico, cloruro de 1-hexil-3-metilimidazolio, y K ₂ HPO ₄ . La fase enriquecida con la vitamina se inyecta directamente en el cromatógrafo.							
C B ₁ B ₂ B ₃ H B ₃ N B ₆ B ₉ B ₁₂	Altima C18, 5µm, 250x4,6 mm	GRADIENTE A=tampon fosfato 10 mM con hexano-1-sulfonato de sodio 3 mM pH 2.8 B=tampon fosfato 10 mM con hexano-1-sulfonato de sodio 3 mM y MeOH, 70:30 pH 5.0 0 min.: 75%A, 25%B 11 min.: 20%A, 80%B	UV 274 nm	Flujo = 1 mL/min t _{análisis} = 20 min T= 30 °C	0.25 ng/µL 0.08 ng/µL 0.013 ng/µL 0.06 ng/µL 0.075 ng/µL 0.1 ng/µL 0.025 ng/µL 0.11 ng/µL	Productos farmacéuticos Orina	Patil&Srivastava, 2012
Tratamiento de muestra: Diversos procesos de extracción en función de las características de las muestras y de la vitamina a estudiar.							

1.1.2. Métodos cromatográficos en presencia de tensioactivos en la fase móvil

Las disoluciones de tensioactivos se emplean en Química Analítica con el fin de mejorar métodos de análisis desde hace más de treinta años. Los agregados micelares que éstos forman en disolución son capaces de aumentar la solubilidad de compuestos prácticamente insolubles en agua, además de mejorar las características analíticas de muchos métodos de análisis.

En disolución acuosa, los agentes tensioactivos permanecen en forma monomérica hasta alcanzar una determinada concentración, denominada concentración micelar crítica (CMC), a partir de la cual se agregan espontáneamente para formar “micelas directas”. Los agregados micelares formados se encuentran en equilibrio dinámico con los monómeros en disolución, siendo la concentración de éstos, constante e igual a la concentración micelar crítica [Mittal & Lindman, 1984]. La presencia de estos agregados está condicionada por el carácter hidrófobo del disolvente y por las concentraciones en disolución de los componentes de la misma: tensioactivo, disolvente orgánico y agua. Los medios micelares modifican los máximos de absorción y de emisión en espectrofotometría, los potenciales red-ox en las reacciones electroquímicas, las constantes de equilibrio y de velocidad y la retención en las técnicas de separación [Mittal & Lindman, 1984; Pramauro & Bianco-Prevot, 1995; Staliskas, 2002; Lin & Yamada, 2003].

El uso de disoluciones de tensioactivos como fases móviles en cromatografía líquida de alta eficacia se inició en los años 80, cuando Armstrong & Nome [1981] y Arunyanart & Cline-Love [1985] describieron los modelos de distribución de un soluto entre las fases estacionaria, móvil y los agregados micelares, originando la técnica denominada Cromatografía Líquida Micelar (MLC).

La variedad de interacciones del soluto con la fase estacionaria, la fase móvil y los agregados formados por el tensioactivo en la fase móvil, hacen de la MLC una técnica versátil para la separación de compuestos de diferente naturaleza, así es posible modificar la retención de un compuesto variando el tipo de carga iónica y la concentración del tensioactivo, el pH de la fase móvil y el tipo y la proporción del

modificador orgánico. Además, comparado con otros eluyentes, las fases móviles con tensioactivo son menos inflamables, más baratas, menos tóxicas, y biodegradables.

Sin embargo existen dos problemas si se compara con la RP-HPLC convencional. En primer lugar, los compuestos mas hidrófobos presentan una elevada retención debido al débil poder de elución de las fases móviles micelares cuando se utilizan fases estacionarias convencionales. En segundo lugar, no hay una óptima transferencia de masa por la resistencia del analito, lo que se traduce en una baja eficacia y por lo tanto, en un ensanchamiento de los picos [Basova et al., 1999; Thomas & Foley, 2007].

Dos estrategias se han propuesto para aumentar la eficacia en MLC, por un lado aumentar la temperatura de la columna, y por otro lado añadir pequeñas cantidades (1-5%, v/v) de alcoholes de cadena corta, como *n*-propanol [Dorsey et al., 1983; Berthod, 1997; Ruíz-Ángel et al., 2009a].

La presencia de *n*-propanol en cantidades mayores del 5% ha demostrado ser útil para resolver tanto el problema de la eficacia, como el inherente a la elevada retención de compuestos hidrofóbos, sin necesidad de un aumento de temperatura [Ramos-Lledó et al., 2001; Aparicio et al., 2000].

El dodecilsulfato sódico (SDS), tensioactivo aniónico, es el único que se ha empleado en la separación y determinación cuantitativa de vitaminas hidrosolubles por RP-HPLC. No se ha encontrado ninguna referencia bibliográfica en la que se utilicen tensioactivos de otra naturaleza (no-iónicos o catiónicos) para la cuantificación de vitaminas.

Por ello, en este capítulo se ha investigado la influencia de tensioactivos tanto catiónicos como no iónicos en la separación de vitaminas hidrosolubles.

La tabla IV.2 resume los trabajos encontrados para la determinación de vitaminas hidrosolubles por HPLC en presencia de tensioactivos.

Tabla IV.2. Determinación de vitaminas hidrosolubles del grupo B por HPLC en presencia de tensioactivos

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q)	MUESTRA	REF.
B ₁ B ₂ B ₃ H B ₃ N B ₆ B ₉	Lichosorb C18, 10µm, 50x3.9 mm	GRADIENTE A = SDS 0.03 M/H ₃ PO ₄ 0.01 M B = PROH 0 min: 100 % A 1-5 min: 1 % A, 99 % B	UV a diferentes λ	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 15 min T ambiente	3.8 mg/L 2.8 mg/L 0.7 mg/L 1.3 mg/L 1.4 mg/L 2.0 mg/L	Productos farmacéuticos	Almagro et al., 2002
<i>Tratamiento de muestra:</i> La muestra se disuelve en una disolución de H ₃ PO ₄ , se filtra y una alícuota se disuelve en la fase móvil A.							
B ₁ B ₂ B ₃ N B ₆	Kromasil C18 5µm, 120x4.6 mm	ISOCRÁTICO SDS 0.1 M/peOH 4% pH = 3	UV a diferentes λ	Flujo: 0 min.: 1 mL/min 6 min.: 2 mL/min t _{salida} = 15 min T = 45 °C	20 ng/mL 3 ng/mL 10 ng/mL 12 ng/mL	Productos farmacéuticos	Monferrer et al., 2003
<i>Tratamiento de muestra:</i> disolución en MeOH/SDS 0.1 M. Filtrar.							
B ₆ Otros vitámeros	Kromasil C18 5µm, 120x4.6 mm	ISOCRÁTICO SDS 0.15 M/peOH 2% pH = 3	UV 290 nm	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 15 min T = 25 °C	10 ng/mL	Productos farmacéuticos Suero	Esteve et al., 2004
<i>Tratamiento de muestra:</i> Las muestras se centrifugan a 3000 rpm durante 10 min. y se congelan. Se inyectan directamente en el cromatógrafo una vez filtradas. Los fármacos se disuelven disolución en MeOH/SDS 0.1 M. Filtrar.							

Tabla IV.2. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q)	MUESTRA	REF.
C B ₁ B ₂ B ₃ B ₆ B ₉ B ₁₂	Particil ODS2, 10µm, 250x4.6mm	GRADIENTE A = SDS 0.02 M /tampón fosfato, pH=3.6 B = SDS 0.02 M /tampón fosfato, pH=3.6/BuOH 0 min: 100 % A 10 min: 75 % A, 25 % B 25 min.: 0% A, 100 % B	UV a diferentes λ	Flujo = 1 mL/min t _{análisis} = 75 min T=25 °C	50 mg/mL 17 mg/mL 4 mg/mL 20 mg/mL 5 mg/mL 7.1 mg/mL 0.12 mg/mL	Productos farmacéuticos	Ghorbani et al., 2004
Tratamiento de muestra: Ninguno							
B ₆ Otros vitámeros	Particil ODS1, 10µm, 250x4.6mm	ISOCRÁTICO 0.065 mM SDS + 3.0% BuOH + 0.02 M tampón fosfato pH=5.5	UV 254 nm Electroquímica +1.2 V versus Ag/AgCl(sat)	Flujo = 1 mL/min t _{análisis} = 16 min T=25 °C	----	----	Hadjmohammadi, 2004
B ₃ H B ₃ N	Kromasil C18 5µm, 250x4.6mm	ISOCRÁTICO SDS 0.15 M/peOH 6% pH=3	UV 440 nm	Flujo = 1 mL/min t _{análisis} = 20 min T=25 °C	8 ng/mL 10 ng/mL	Productos farmacéuticos Sero Orina	Capellá et al., 2004
Tratamiento de muestra: Las muestras de suero, centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min. y las muestras de orina se congelan. Los fármacos se disuelven en MeOH/SDS 0.1 M. Filtrar.							

1.2. Métodos cromatográficos para la determinación de vitaminas hidrosolubles del grupo B en mieles.

En la tabla IV.3 se recogen los trabajos encontrados en la bibliografía actual sobre los métodos de análisis para determinar el contenido de vitaminas en mieles, y como se puede observar, se han encontrado muy pocos trabajos. La mayoría de las publicaciones encontradas recogen el análisis de una vitamina y en ocasiones muy pocas muestras, con lo que es difícil sacar conclusiones del contenido general de vitaminas en mieles.

Se ha llevado a cabo la determinación de tiamina (vitamina B₁) en muestras de miel utilizando un proceso de microextracción líquido-líquido dispersivo acoplado a cromatografía líquida con detección por fluorescencia para su pre-concentración y determinación [Viñas et al., 2012]. La detección se llevo a cabo en este caso por derivatización de la vitamina a tiocromo. Este método se ha aplicado a alimentos ricos en vitamina B₁ como cerveza, levadura, miel, fórmulas infantiles, leche fermentada, cereales y purés. En miel se obtuvo una concentración de tiamina de 0.021 mg/100 g, que es la más baja entre todos los alimentos analizados.

El mismo grupo de investigación ha determinado en dos trabajos diferentes, los vitámeros de las vitaminas B₂ y B₆ en mieles. De los 3 vitámeros analizados de la vitamina B₂ (riboflavina y las coenzimas flavín mononucleótido y flavín adeninodinucleótido), la única que aparece en mieles es la forma libre, riboflavina. Las cantidades encontradas de este compuesto son 0.015 mg/100 g en mieles de eucalipto, caña y multifloral, aumentando hasta 0.074 mg/100 g en mieles de castaño [Viñas et al., 2004b]. En el caso de la vitamina B₆, los 3 vitámeros analizados fueron piridoxina, piridoxal y piridoxamina, además de sus correspondientes formas fosforiladas y su producto de excreción (ácido 4-piridóxico). En este trabajo se han analizado mieles de azahar, eucalipto, romero y milflores. En todas se encontró piridoxal y su producto de excreción, hecho bastante curioso, ya que es en el único alimento analizado, en el que apareció dicho metabolito y en cantidades bastante superiores, al encontrado para las formas activas de la vitamina. En la miel de eucalipto y en la milflores aparece además la forma piridoxina, en concentraciones de 0.018 y 0.021 mg/100 g respectivamente [Viñas et al., 2004a].

Tabla IV.3. Determinación de vitaminas hidrosolubles del grupo B por HPLC en mieles

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L.Q)	TIPO DE MIEL	REF.
B ₂ Otros vitámeros	RP-Amide C16, 5µm, 150x4,6 mm	ISOCRÁTICO ACN/tampón fosfato 0.010 M, pH 5.0 10:90	FL 270/516 nm (452/516 nm en mieles)	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 14 min T ambiente	0.3 ng/mL	Eucalipto Castaño Multifloral (Caña de azúcar)	Viñas et al., 2004a
<i>Tratamiento de muestra:</i> A las muestras de miel, 1-2 g, se añade ACN, se homogeniza durante 10 min y se añade el tampón fosfato. Se centrifuga a 6000 rpm durante 5 min. y el sobrenadante se diluye con el tampón fosfato y se filtra.							
B ₆ Otros vitámeros	RP-Amide C16, 5µm, 150x4,6 mm	ISOCRÁTICO KH ₂ PO ₄ 0.05 M pH=7.0	FL 335/389 nm	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 7 min T ambiente	3 ng/mL	Eucalipto Romero Naranja Multifloral	Viñas et al., 2004b
<i>Tratamiento de muestra:</i> Las muestras de miel, 0.5 g, se someten a una hidrólisis ácida con ácido perclórico, se homogeniza durante 30 s con ultrasónicos. Se centrifuga a 6000 rpm durante 5 min. y el sobrenadante se diluye con la fase móvil y se filtra.							
C B ₂ B ₃ H B ₅ B ₉	ALLtima C18, 5µm, 250x4,6 mm	GRADIENTE A = TFA 0.025% B = ACN 0 min: 100 % A 11 min: 75 % A, 25 % B 19 min: 55 % A, 45 % B	UV 254 nm (C y B ₃ H) 210 nm	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 20 min T ambiente	0.1 mg/kg 0.25 mg/kg 0.25 mg/kg 0.58 mg/kg 0.15 mg/kg	Eucalipto Espliego Romero Acacia Tilo Cardo Brezo Madroño Cítrica Zulla Asfódelo Multifloral	Ciulu et al., 2011
<i>Tratamiento de muestra:</i> Disolución en NaOH 2 M y tampón fosfato 1 M. Filtrar.							

Tabla IV.3. (continuación)

VITAMINAS	COLUMNA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	OTRAS CONDICIONES	L.D. (L-Q)	TIPO DE MIEL	REF.
B ₁	RP-Amide C16, 5µm, 150x4.6 mm	ISOCRÁTICO KH ₂ PO ₄ 0.01 M/ACN pH=7.0 90:10	FL 375/438 nm	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 8 min T ambiente	0.09 ng/mL	Sin especificar	Víñas et al., 2012
<i>Tratamiento de muestra:</i> Derivatización en presencia de ferricianuro potásico en medio básico. Diluir en agua y filtrar.							
B ₂ Otros metabolitos	Gemini C18, 3µm, 150x4.6 mm	GRADIENTE A = H ₃ PO ₄ 0.2 M B = ACN 0 min: 90 % A, 10% B 5 min: 65 % A, 35 % B 10 min: 10 % A, 90 % B	UV 360 nm	Flujo = 1 mL/min t _{salida} = 30 min T ambiente	0.2 mg/kg	Eucalipto Madroño Cítrica Asfódelo Menta Espina santa Sauce Salvia Ajedrea Mielato de castaño	Tuberoso et al., 2012
<i>Tratamiento de muestra:</i> Las muestras de miel se diluyeron en agua y se filtraron.							

Tuberoso et al. [2012] han analizado la cantidad de vitamina B₂ en 117 muestras de miel originarias de Italia y Croacia encontrando cantidades pequeñas de la misma, inferiores a 0.61 mg por 100 g de miel.

Ciulu et al. [2011] determinaron conjuntamente las vitaminas C, B₂, B₃H, B₅ y B₉; sin embargo, dos importantes vitaminas que se han encontrado en muestras de miel como son la tiamina (B₁) y la piridoxina (B₆) no se han analizado en este trabajo. Los autores han desarrollado un método de RP-HPLC en modo gradiente con un tiempo de análisis de 20 minutos. Se ha detectado las vitaminas B₃H y C en todas las muestras analizadas, aunque en alguna de ellas la concentración está por debajo del límite de cuantificación. Las vitaminas B₉ y B₂ se han encontrado en aproximadamente la mitad de las muestras y la vitamina B₅ es la que se detecta en un menor número de las mieles analizadas.

1.3. Propiedades nutritivas de la miel

La Cantidad Diaria Recomendada de un nutriente (CDR) se define como *«la cantidad que una persona sana debe ingerir por término medio cada día, a través de la dieta, para mantener un buen estado de salud»*, Real Decreto 1487/2009 [BOE nº244 del 9 de octubre 2009]. Esta cantidad se determina por organismos internacionales de acuerdo a criterios científicos y después se introduce en la legislación de cada país.

En la tabla IV.4 se resumen los resultados del contenido de vitaminas en miel encontrados en la bibliografía. Estos resultados se han comparado con la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) para cada una de estas vitaminas [DOUE L 285/9 de 29 de octubre de 2008]. Además se recoge en esta tabla, el porcentaje que supondrían sobre la CDR estas cantidades si tomamos 100 g de miel. Esta cantidad de miel, a primera vista, supone un valor grande para ingerirla diariamente, pero equivale a unas 5 cucharadas de miel (21 g por cucharada) por lo que si sustituimos el edulcorante más habitual, el azúcar, por miel, realmente no es una cantidad tan desmesurada. Como puede observarse en la tabla IV.4 y contrariamente a lo que se creía, en algunos tipos de mieles se supera el 15% de la CDR, y se puede de este modo especificar en el envase: “fuente de vitamina” [DOUE L 404/9 de 30 de diciembre 2006] al haberse superado el valor de “cantidad significativa”, cuya definición se recoge en la Directiva 2008/100/CE: «...para decidir lo que constituye una cantidad significativa se considera

Tabla IV.4. Recopilación bibliográfica del contenido de vitaminas del grupo B en mieles. Comparación con la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) y el porcentaje que supondría de la CDR si ingerimos 100 g de miel o 21 g (una cucharada).

¹ % de CDR > 15%, por lo que se podría etiquetar el producto como "fuente de vitamina..."; 2% de CDR > 30% por lo que se podría etiquetar el producto como "alto contenido de vitamina...".

Vitamina	CDR	[Vitamina], mg/100g	% CDR, 100g/20g	Tipo de miel (n° de muestras)	Referencia
B ₁	1.1 mg	0.006	0.5 / 0.1	Varios tipos de miel (31)	Haydak et al., 1942
		0.004	0.4 / 0.08	Varios tipos de miel (29)	Kitzes et al., 1943
		0.02	2 / 0.04	Sin especificar (1)	Viñas et al., 2012
B ₂	1.4 mg	0.061	4 / 0.8	Varios tipos de miel (31)	Haydak et al., 1942
		0.026	1.9 / 0.4	Varios tipos de miel (29)	Kitzes et al., 1943
		0.01	1 / 0.2	Eucalipto (1)	Viñas et al., 2004(b)
		0.01	1 / 0.2	Caña de azúcar (1)	
		0.07	5 / 1	Castaño (1)	
		0.02	1 / 0.2	Milflores (1)	
		0.22	16 ¹ / 3.2	Eucalipto (5)	Ciulu et al., 2011
		0.37	26 ¹ / 5.2	Asfodelo (3)	
		0.40	29 ¹ / 3.2	Lavanda (2)	
		0.10	7 / 1.4	Milflores (1)	

Tabla IV.4. (continuación)

Vitamina	CDR*	[Vitamina], mg/100g	% CDR, 100g/20g	Tipo de miel (n° de muestras)	Referencia
B ₃	16 mg	0.036	0.2 / 0.04	Varios tipos de miel (31)	Haydak et al., 1942
		0.11	0.7 / 0.1	Varios tipos de miel (29)	Kitzes et al., 1943
		0.50	3.1 / 0.6	Sulla (3)	Ciulu et al., 2011
		2.60	16.2 ¹ / 3.2	Azahar (3)	
		0.58	3.6 / 0.7	Asfodelo (3)	
		0.50	3.1 / 0.6	Acacia (2)	
		0.86	5.4 / 1.1	Cardo (3)	
		0.59	3.7 / 0.7	Brezo (1)	
		0.70	4.4 / 0.9	Tilo (1)	
		0.80	5.0 / 1	Milflores (1)	
B ₅	6 mg	0.10	2 / 0.4	Varios tipos de miel (31)	Haydak et al., 1942
		0.05	1 / 0.2	Varios tipos de miel (29)	Kitzes et al., 1943
		0.52	9 / 1.8	Sulla (3)	Ciulu et al., 2011
		1.60	27 ¹ / 5.4	Asfodelo (3)	

Tabla IV.4. (continuación)

Vitamina	CDR	[Vitamina], mg/100g	% CDR, 100g/20g	Tipo de miel (n° de muestras)	Referencia
B ₆	1.4 mg	0.30	21 ¹ / 4.3	Varios tipos de miel (31)	Haydak et al., 1942
		0.01	1 / 0.2	Varios tipos de miel (29)	Kitzes et al., 1943
	Piridoxina (PN), piridoxal (PL) y piridoxamina (PM)	0.083 (PL)	6 / 1.2	Azahar (1)	
		0.057 (PN + PL) 0.036 (PN + PL) 0.014 (PL)	4 / 0.8 3 / 0.6 1 / 0.2	Eucalipto (1) Miflores (1) Romero (1)	Viñas et al., 2004(a)
B ₇	0.05 mg	0.00007	0.1 / 0.02	Varios tipos de miel (29)	Kitzes et al., 1943
		0.013	27 ¹ / 5.4	Sin especificar (1)	Hayakawa et al., 2008
B ₉	0.20 mg	0.003	1.5 / 0.3	Varios tipos de miel (29)	Kitzes et al., 1943
		0.56	280 ² / 56 ²	Eucalipto (5)	
		0.17	85 ² / 17 ¹	Romero (1)	Ciulu et al., 2011
		0.12	60 ² / 12 ¹	Tilo (1)	
		0.18	90 ² / 18 ¹	Miflores (1)	

¹ % de CDR > 15%, por lo que se podría etiquetar el producto como "fuente de vitamina...". ² % de CDR > 30% por lo que se podría etiquetar el producto como "alto contenido de vitamina...".

un 15% de la cantidad recomendada especificada en el presente anexo y suministrada por 100 g o 100 ml o por envase, si este contiene una única porción». Otra mención de todavía mayor relevancia es la de “alto contenido”. Para ser “alto contenido” en una vitamina, el producto tendría que contener «...como mínimo dos veces el valor de la fuente...» [DOUE L 404/9 de 30 de diciembre 2006].

En la tabla IV.4 se aprecia que sólo en algún tipo de miel se rebasan estos porcentajes. Son destacables los altos contenidos encontrados por Ciulu et al. [2011] para el ácido fólico (B_9) en varios tipos de mieles y sobre todo en una de eucalipto en la que casi triplica la CDR. También aparecen como fuente de vitamina B_2 tres variedades de miel, entre ellas, miel de espliego. Pero estos resultados deberían ser contrastados analizando un número mayor de muestras para que fuesen fiables, ya que los datos mostrados son para 1, 2 o como máximo 5 muestras de cada tipo de miel, lo cual no es representativo del producto; aunque da una idea de los niveles de vitaminas que contiene este alimento.

2. OBJETIVOS

1. Desarrollar un método analítico por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC), en modo isocrático, utilizando detección UV-visible y de fluorescencia en serie, para la determinación de vitaminas hidrosolubles del grupo B. Estudiar la influencia de la adición de un tensioactivo a la fase móvil en el proceso de separación de las vitaminas.
2. Determinar el contenido de vitaminas hidrosolubles del grupo B en las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y disoluciones

Los reactivos ácido D-pantoténico (B_5) y nicotinamida (B_3N) han sido suministrados por Fluka (Madrid, España); el ácido fólico (B_9), el ácido nicotínico (B_3H), el clorohidrato de tiamina (B_1), el clorohidrato de piridoxina (B_6) y la riboflavina (B_2) fueron proporcionados por Sigma (Barcelona, España); *n*-butanol, etanol, metanol y *n*-propanol por Scharlab (Barcelona, España); el bromuro de hexadeciltrimetilamonio

(CTAB) ha sido suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania); el polioxietilen-23 lauril éter (Brij-35) por Aldrich (Madrid, España); el ácido sulfúrico es de Merck (Darmstadt, Alemania) y el ácido orto-fosfórico de Panreac (Barcelona, España).

Las disoluciones estándar de las vitaminas se han preparado en agua ultrapura, con excepción de la vitamina B₂, que se ha disuelto en medio ácido (0.5 mL de H₃PO₄ conc.) y la vitamina B₉, disuelta en medio alcalino (0.2 mL de NaOH 0.1M). Todas las disoluciones fueron guardadas en la oscuridad a 4°C.

3.2. Muestras de miel

Este estudio se ha llevado a cabo con 30 muestras de miel de los 6 orígenes botánicos estudiados en esta tesis doctoral: castaño, espliego, tomillo, romero, viborera y mielatos. Las mieles fueron almacenadas a 4°C hasta su análisis.

3.3. Instrumentación

El sistema de cromatografía líquida de alta eficacia utilizado está compuesto por una bomba binaria modelo 250 de Perkin-Elmer, un sistema de inyección con una válvula Rheodyne de 20 µL de capacidad de Knauer, un sistema de termostatación Jet-Stream Plus de Knauer, un detector de longitud de onda programable UV/VIS modelo 785A de Applied Biosystems, un detector de fluorescencia programable modelo serie 200 y una interfase modelo 950A, ambos de Perkin-Elmer. Para la adquisición y tratamiento de los datos cromatográficos se dispuso del software Turbochrom Navigator PE-Nelson V6.2.1 de Perkin-Elmer.

Las columnas cromatográficas empleadas, en ausencia y en presencia de tensioactivos, son µBondapack C₁₈, (10 µm, 150x3.9 mm), fueron suministradas por Waters (Milford, EEUU). En todos los casos el volumen inyectado es de 20 µL y el flujo de la fase móvil de 0.9 mL/min.

La detección UV se ha llevado a cabo a dos longitudes de onda, de 0 a 8 minutos a 254 nm y a partir de 9 minutos a 200 nm para detectar la vitamina B₅. En el detector de fluorescencia se programó una longitud de onda de 290 nm de excitación y 396 nm de emisión, para la detección de la vitamina B₆. Cuando se utiliza el tensioactivo CTAB en la fase móvil, el detector UV se mantiene en 254 nm. El detector de fluorescencia

se programa, de 0 a 4 minutos la longitud de onda de excitación en 290 nm y la de emisión en 396 nm, para la detección de vitamina B₆; de 4 a 8 minutos la longitud de onda de excitación, en 450 nm y la de emisión, en 520 nm, para la detección de la vitamina B₂.

3.4. Procedimiento

La separación de las vitaminas se ha llevado a cabo empleando como fase móvil de partida la que se ha descrito en el capítulo III para el análisis de vitamina C, descrita también por Esteve et al.[1998] para la determinación de piridoxina. Se ha estudiado la influencia de la temperatura de la columna cromatográfica y el pH de la fase móvil, la adición, como modificadores orgánicos, de alcoholes de cadena corta en diferentes porcentajes y por último se ha investigado la influencia de dos tensioactivos (catiónico y no iónico), en la separación cromatográfica.

3.4.1. Optimización de la fase móvil

Con el fin de conseguir la mejor separación del mayor número de vitaminas con un método de elución isocrático, en primer lugar se ha realizado un estudio de optimización de la fase móvil.

La fase móvil inicial es H₂SO₄ 0.01% (v/v) a pH 2.5. Posteriormente, se ha procedido a modificar la misma en función de los siguientes parámetros: pH (intervalo comprendido entre 2.5 y 3.7), temperatura (entre 25°C y 40°C) y por último, la adición de pequeños porcentajes, entre 1 y 10% (v/v), de metanol, etanol, *n*-propanol y *n*-butanol.

En un segundo estudio, se ha añadido un tensioactivo a la fase móvil con el fin de mejorar la separación de las vitaminas. Los tensioactivos utilizados han sido, uno no iónico, polioxietilen-23 lauril éter (Brij 35) en una concentración 5 mM en presencia de metanol 2% (v/v), y otro catiónico, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), cuyo intervalo de concentraciones estudiadas ha estado comprendido entre 10⁻⁴ y 0.02 M, concentraciones por encima y por debajo de la concentración micelar crítica (9 10⁻⁴ M). Se ha estudiado la influencia sobre la separación de la presencia de MeOH, *n*-PrOH y *n*-BuOH, en porcentajes comprendidos entre 1 y 10% (v/v).

3.4.2. Características analíticas de los métodos cromatográficos

Las características analíticas de los métodos cromatográficos en ausencia y en presencia de tensioactivo se han determinado mediante el método del patrón externo, empleando el área del pico cromatográfico como señal analítica en la recta de calibrado. El intervalo de concentraciones para cada una de las vitaminas es de 0.05 a 10.0 mg/L para las vitaminas B₁ y B₅, de 0.025 a 10.0 mg/L para la vitamina B₆, de 2 · 10⁻³ a 62 mg/L para la vitamina B₂, de 0.2 a 100 mg/L para las vitaminas B₃N y B₃H y de 0.1 a 800 mg/L para la vitamina C.

La sensibilidad del método se expresa como la pendiente de la recta de calibrado. Los límites de detección y de cuantificación se calculan como la concentración que produce una señal igual a 3 veces la desviación estándar de la ordenada en el origen. El límite de cuantificación se calcula de la misma forma pero 10 veces la desviación estándar de la ordenada. La robustez se calcula como la desviación estándar relativa (%RSD) de la pendiente de la curva de calibración medida en 4 días diferentes. En cuanto a la repetitibilidad y la reproducibilidad se calcularon como la precisión (%RSD) en la media de los tiempos de retención y el área de pico de cada vitamina medida 10 veces en el mismo día y en días diferentes, respectivamente.

3.4.3. Análisis de las vitaminas en las muestras de miel

Las muestras fueron preparadas disolviendo entre 5 g y 15 g de miel en 25 mL de agua ultrapura. Una vez disueltas, se filtraron a través de un filtro de jeringa de nylon de 0.45 µm, y se inyectaron en el sistema cromatográfico.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las vitaminas analizadas son B₁ (tiamina), B₂(riboflavina), B₃N (nicotinamida), B₃H (ácido nicotínico), B₅ (ácido D-pantoténico) y B₆ (piridoxina). Aunque en principio se ha incluido la vitamina B₉ (ácido fólico), ésta se descartó posteriormente por su inestabilidad y su baja solubilidad en medio ácido, lo que complicaba su determinación conjunta con el resto. La vitamina C también se ha incluido en este estudio aunque no se ha cuantificado en las muestras, al tener ya los resultados descritos en el capítulo III de esta memoria. Por otra parte, como se ha comentado anteriormente, las únicas

vitaminas que se detectan por fluorescencia son la vitamina B₂ y B₆ que tienen fluorescencia nativa, el resto son determinadas con detección UV.

4.1. Influencia del pH, la temperatura y la adición de un alcohol de cadena corta a la fase móvil en la separación cromatográfica de las vitaminas hidrosolubles con una fase móvil H₂SO₄ 0.01% (v/v).

La separación de las vitaminas del grupo B se ha llevado a cabo partiendo de la fase móvil H₂SO₄ 0.01% (v/v), ya que es una disolución ácida en medio acuoso sencilla y de muy bajo coste. Con esta fase móvil y en las condiciones utilizadas para la determinación de vitamina C, se obtuvo una separación muy pobre con una baja resolución entre los picos de las vitaminas B₁, B₃N, B₃H, B₅, B₆ y C. Además las vitaminas B₂ y B₉, menos polares que el resto, no se pueden eluir de la columna en tiempos de análisis razonables.

Con el fin de obtener la mejor separación de las vitaminas en el menor tiempo posible, se estudia la influencia de diferentes parámetros experimentales partiendo de la fase móvil anterior.

4.1.1. Influencia del pH

La gran diferencia existente entre las estructuras químicas de las vitaminas hidrosolubles, hace que su carácter ácido-base sea muy diferente también, por lo que el pH del medio afectara a todas ellas de forma muy dispar. Por ello, la variación de la retención cromatográfica con el pH, en una columna de fase inversa apolar como la C₁₈ empleada en este trabajo, es diferente para cada una de las vitaminas.

En general, la mayoría de estas vitaminas son más estables a pH ácido y por ello se han estudiado intervalos de pH ácidos.

El pH de la fase móvil se ha estudiado en el intervalo de 2.5 a 3.7, que es la zona en la que se obtenían tiempos de retención adecuados de todos los valores de pH. En la figura IV.1 se muestra la variación del factor de retención con el pH para todas las vitaminas.

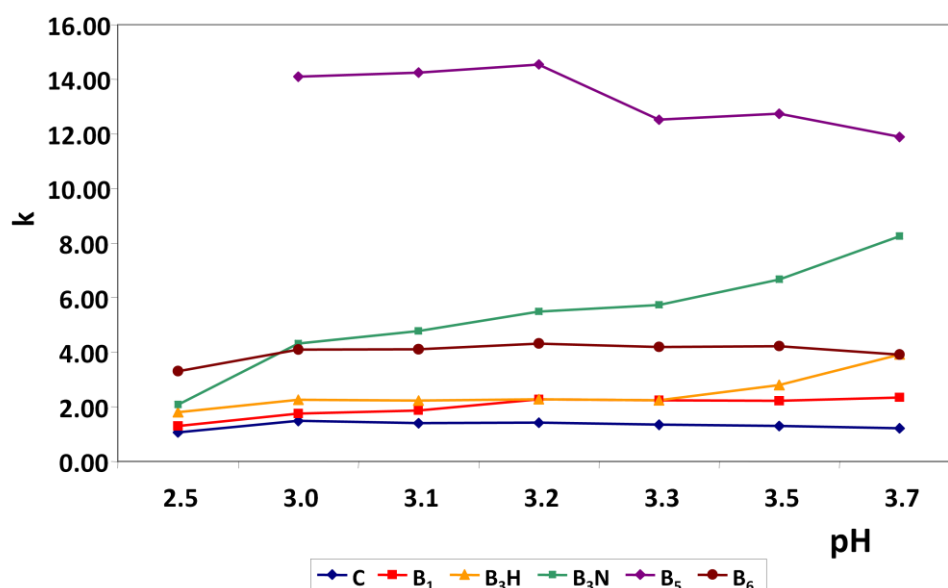


Figura IV. 1. Variación del factor de retención de las vitaminas con el pH de la fase móvil H₂SO₄ 0.01%/25°C.

Como se observa, al aumentar el valor del pH se obtiene una mayor retención de algunas vitaminas, B₅, B₃N y B₆, además de una mejora importante en la resolución entre picos. Se puede observar que mientras algunas vitaminas como la vitamina C, B₁ o B₆ apenas modifican su retención, otras lo hacen significativamente, como es el caso de las vitaminas B₃H y B₃N que intercambian el orden de elución con las vitaminas B₁ y B₆, respectivamente. El valor de pH elegido para continuar la optimización del método fue de 3.5, al cual se obtiene la mejor separación.

4.1.2. Influencia de la temperatura

La temperatura es otro parámetro experimental que modifica de forma importante la retención de un compuesto en la fase estacionaria y, su distribución entre ésta y la fase móvil. Por ello, a continuación, se ha llevado a cabo el estudio del efecto de la temperatura de la columna cromatográfica sobre la eficacia y resolución de los picos. Así, se ha trabajado a 25°C, 30°C, 35°C y 40°C. Como era de esperar, a mayor temperatura, la retención de las vitaminas es menor. En la figura IV.2 se muestran los cromatogramas obtenidos a diferentes temperaturas con la fase móvil de H₂SO₄ al 0.01% a pH 3.5.

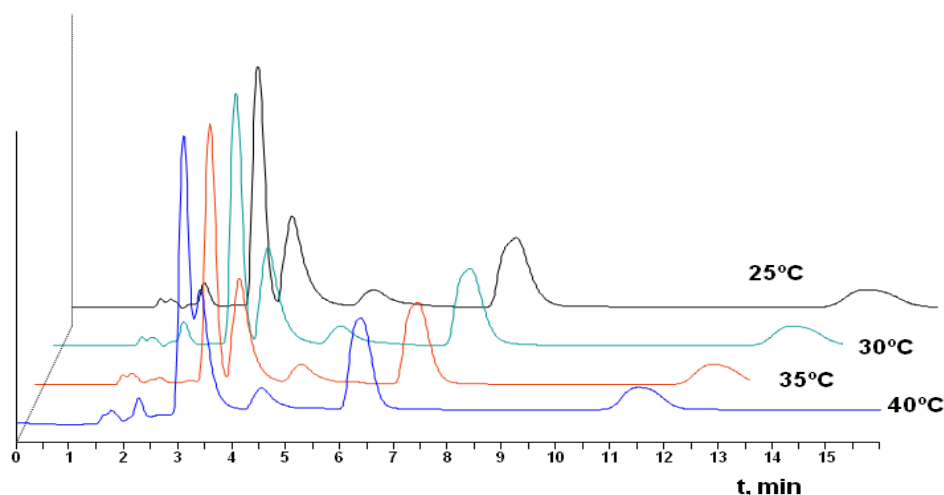


Figura IV.2. Cromatogramas a diferentes temperaturas con la fase móvil H_2SO_4 0.01%/pH 3.5. Detección UV a 200 nm.

Cuando se lleva a cabo el análisis a 40°C, hay una pérdida de resolución entre los picos de la vitamina B_1 y el ácido nicotínico (B_3H). Además, la mejora de la eficacia al aumentar la temperatura no es muy relevante, por lo que se elige 25°C como temperatura de trabajo, asegurando de esta forma una menor degradación de las vitaminas.

La figura IV.3 muestra el cromatograma obtenido con la fase móvil H_2SO_4 0.01%/pH=3.5 a una temperatura de 25°C. La vitamina B_2 no aparece en el cromatograma ya que presenta una elevada retención en la columna cromatográfica a cualquiera de las temperaturas estudiadas. En estas condiciones se consigue la separación de 6 vitaminas hidrosolubles en 16 minutos.

4.1.3. Influencia de la adición de un alcohol de cadena corta a la fase móvil

Con el fin de determinar la vitamina B_2 , se ha estudiado la posibilidad de reducir el tiempo de retención de esta vitamina adicionando diferentes porcentajes de un alcohol de cadena corta, MeOH, EtOH, *n*-PrOH y *n*-BuOH, a la fase móvil. Los porcentajes estudiados han estado comprendidos entre el 2%(v/v) y el 10% (v/v) para todos los alcoholes, excepto para el MeOH, del que se adicionaron porcentajes entre el 2% y el 100% por tener este alcohol mayor margen de maniobra, por su mayor polaridad.

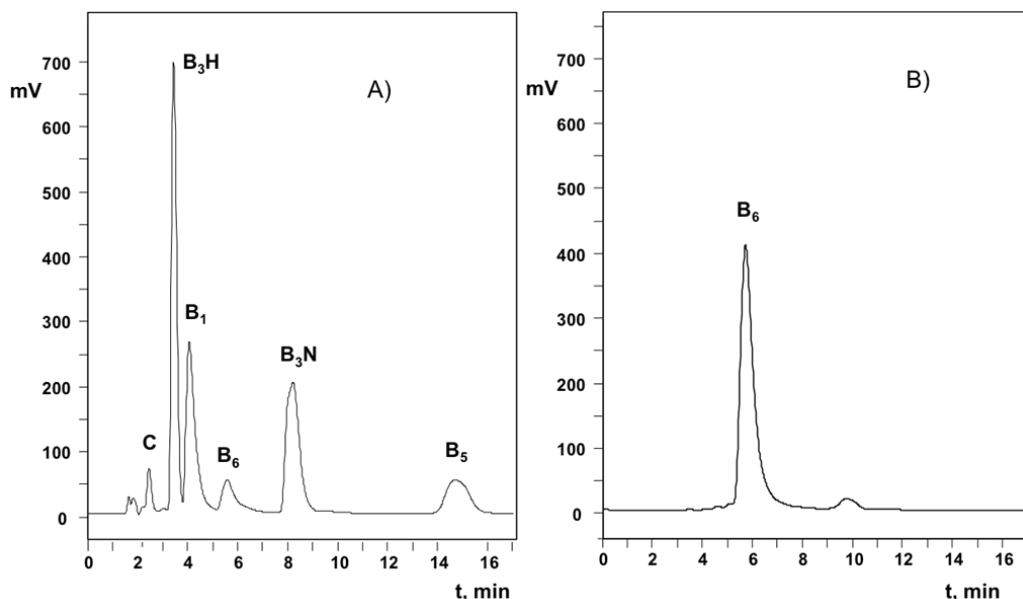


Figura IV.3. Cromatogramas de la separación de las vitaminas con una fase móvil H_2SO_4 0.01%/pH 3.5/25 °C A) Detección UV a 200nm. B) Detección FL a 290/396 nm.

La adición del alcohol de cadena más larga, *n*-butanol, hace que la vitamina B₂ tenga un tiempo de retención corto y por tanto, se podría determinar empleando esta fase móvil con un porcentaje optimizado de este alcohol. Sin embargo, el resto de las vitaminas disminuyen muy significativamente su tiempo de retención hasta prácticamente el tiempo muerto y no se pueden separar. Por tanto, este alcohol no es adecuado para la separación de todas las vitaminas. Este mismo hecho se encuentra cuando se adicionan alcoholes de cadena más corta, MeOH, EtOH y *n*-PrOH en proporciones elevadas, que permiten la elución en tiempos razonables de la vitamina B₂, pero el resto de vitaminas apenas son retenidas por la columna.

La figura IV.4 muestra los factores de retención obtenidos para las vitaminas, con la adición, a la fase móvil, de cada uno de los alcoholes.

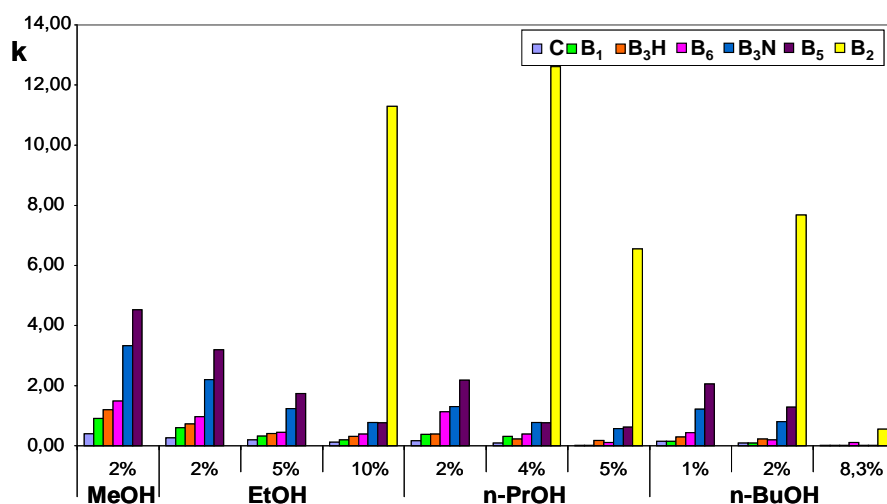


Figura IV.4. Variación del factor de retención de las vitaminas hidrosolubles en función del porcentaje de distintos modificadores orgánicos en la fase móvil H_2SO_4 0.01%/ pH 3.5/25°C.

En la figuraIV.5 se representa la retención de la vitamina B₂ con el porcentaje de MeOH en la fase móvil.

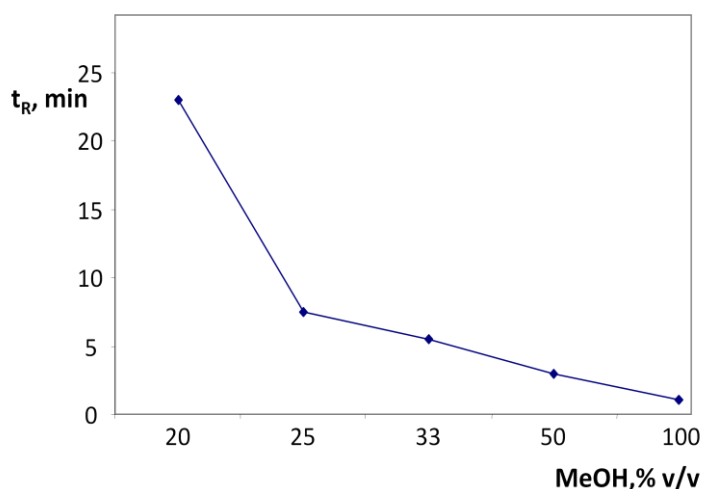


Figura IV.5. Tiempo de retención de la vitamina B₂ a diferentes porcentajes de MeOH en la fase móvil H_2SO_4 0.01%/pH 3.5/25°C.

Se observa que es necesario adicionar a la fase móvil, como mínimo un 20% del alcohol, para obtener un tiempo de retención de la vitamina B₂ menor de 25 minutos. El problema es que el resto de vitaminas eluyen demasiado pronto, próximas al tiempo muerto. Por tanto, sólo con la adición de un alcohol a la fase móvil, no es posible la separación de todas las vitaminas incluida la vitamina B₂.

Si obviamos la vitamina B₂, al adicionar un 2% de MeOH a la fase móvil, el tiempo de análisis se reduce de 16 minutos a 11 minutos. Por tanto, esta es la fase móvil óptima para la separación y determinación de las vitaminas C, B₁, B₃H, B₃N, B₅ y B₆. La figura IV.6 muestra el cromatograma de la separación obtenida en presencia de un 2% de metanol.

La vitamina B₅ no tiene grupos cromóforos, pero si exhibe una ligera absorción a 200 nm debido a los grupos carbonilo [Blake, 2007]. Por ello y con el fin de detectarla al final del cromatograma, a un tiempo de 9 minutos, se cambia la longitud de onda a 200 nm.

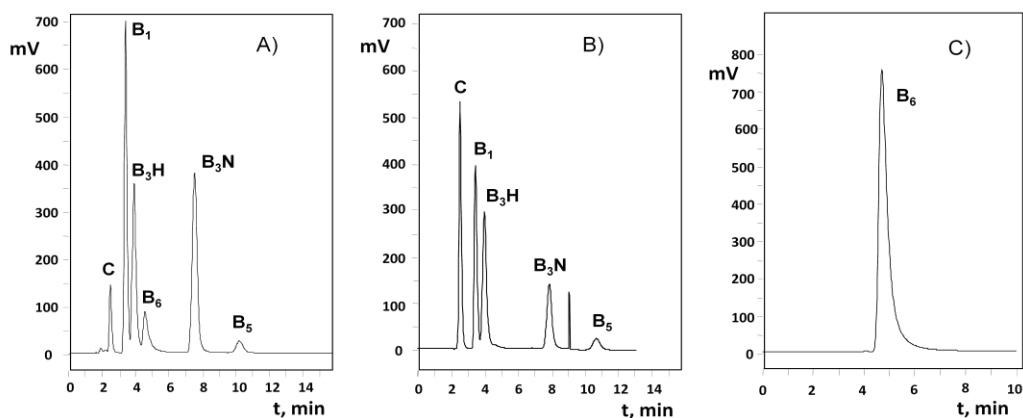


Figura IV.6. Separación de las vitaminas con la fase móvil H₂SO₄ 0.01%/2% MeOH/pH 3.5/25°C. (A) Detección UV a 200 nm (B) Detección UV a 254 nm y 200 nm a partir de 9 minutos (C) detección FL a 290/396 nm.

Es importante también destacar que se produce un cambio en el orden de elución de la vitamina B₁ y el ácido nicotínico (B₃H) con esta fase móvil, con respecto a la misma sin metanol.

Como conclusión, en las condiciones de pH y temperatura elegidas para el método cromatográfico, con y sin MeOH, en modo isocrático, se consigue determinar 5 vitaminas del grupo B y la vitamina C. Aunque esta última tiene un tiempo de retención cercano al tiempo muerto del sistema cromatográfico, lo que hace que no sea útil para cuantificar. La adición a la fase móvil de un 2% de MeOH reduce el tiempo de análisis de 16 a 10 min, con una buena resolución entre picos. En ninguno de los casos anteriores cuando se emplea una fase móvil H₂SO₄ 0.01% a pH=3.5 y a 25°C, ni en ausencia ni en presencia de metanol, se puede determinar la vitamina B₂.

4.2. Influencia de la adición de tensioactivos a la fase móvil en la separación cromatográfica de vitaminas hidrosolubles.

La vitamina B₂ aparece en muestras de miel como ha sido descrito en la bibliografía [Haydak et al., 1942; Viñas et al, 2004b; Ciulu et al., 2011], por lo que su determinación es importante cuando se analizan este tipo de muestras. Por ello, con el fin de obtener una buena separación de las vitaminas hidrosolubles en la que se pueda determinar la vitamina B₂, se ha adicionado un tensioactivo a la fase móvil. Los tensioactivos modifican la distribución de los compuestos entre la fase estacionaria y la fase móvil y por tanto, los tiempos de retención, la sensibilidad y selectividad del método. En este trabajo en concreto, se estudia si la vitamina B₂, de solubilidad menor en agua que el resto de vitaminas hidrosolubles, puede disminuir su tiempo de retención en la columna cromatográfica por la presencia de un agente tensioactivo. Las disoluciones de tensioactivos, además, tienen la ventaja de que son ópticamente transparentes, estables y relativamente no tóxicas.

Cuando se adiciona un tensioactivo a la fase móvil, los compuestos se van a repartir entre la fase estacionaria y la fase móvil, en la que han formado micelas o únicamente disolviéndose en ella. Este hecho modifica su retención en el sistema cromatográfico y desarrolla una selectividad única para algunos de ellos [Armstrong & Nome, 1981; Ruiz-Ángel et al., 2009a y 2009b].

En investigaciones previas de nuestro grupo de investigación, se ha desarrollado un método cromatográfico para determinar vitaminas hidrosolubles con un gradiente de elución utilizando un tensioactivo aniónico, docecilsulfato de sodio (SDS) y *n*-propanol. El tiempo de análisis es de 11 minutos [Almagro et al., 2002]. Este

tensioactivo proporciona una buena separación en modo gradiente que no es posible en modo isocrático. Para conocer el comportamiento de estos analitos frente a un tensioactivo de diferente naturaleza, se ha empleado un tensioactivo no iónico (polioxietilen-23 lauril éter, Brij 35) y otro catiónico (bromuro de hexadeciltrimetilamonio, CTAB) en concentraciones por encima y por debajo de su concentración micelar crítica ($CMC_{Brij35} = 9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ y $CMC_{CTAB} = 9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$).

El tensioactivo no iónico, Brij 35, no ofrece ninguna posibilidad de separación de todas las vitaminas en ninguna de las concentraciones estudiadas. En todos los casos, los tiempos de retención obtenidos son muy bajos y próximos al tiempo muerto de la columna.

El cuanto al tensioactivo catiónico, CTAB, las concentraciones estudiadas están comprendidas entre 10^{-4} M y 0.02 M . Con concentraciones menores de $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ no se consigue estabilizar la columna hasta pasadas al menos dos horas, además la desviación entre los tiempos de retención de las vitaminas para varias inyecciones es muy grande, por lo que concentraciones menores de ésta no son útiles para optimizar la separación. Las concentraciones mayores de $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ producen picos cromatográficos anchos que dificultan una buena separación entre los picos de las vitaminas. Por ello, se ha estudiado la retención cromatográfica de las vitaminas en presencia de CTAB en la fase móvil en combinación con la adición de un 2% de MeOH, *n*-PrOH y *n*-BuOH para mejorar la eficacia de los picos cromatográficos. La figura IV.7 muestra la variación del factor de retención en función del concentración de CTAB en la fase móvil en presencia del 2% (v/v) los tres alcoholes.

Se encontró que 0.01 M es la mínima concentración de CTAB que consigue estabilizar la columna en un tiempo corto y se separan un número aceptable de vitaminas. Entre los alcoholes de cadena corta, se eligió el de mayor polaridad, MeOH al 2%, para conseguir retener algo más las vitaminas que con *n*-PrOH y *n*-BuOH tienden a eluir con el tiempo muerto de la columna.

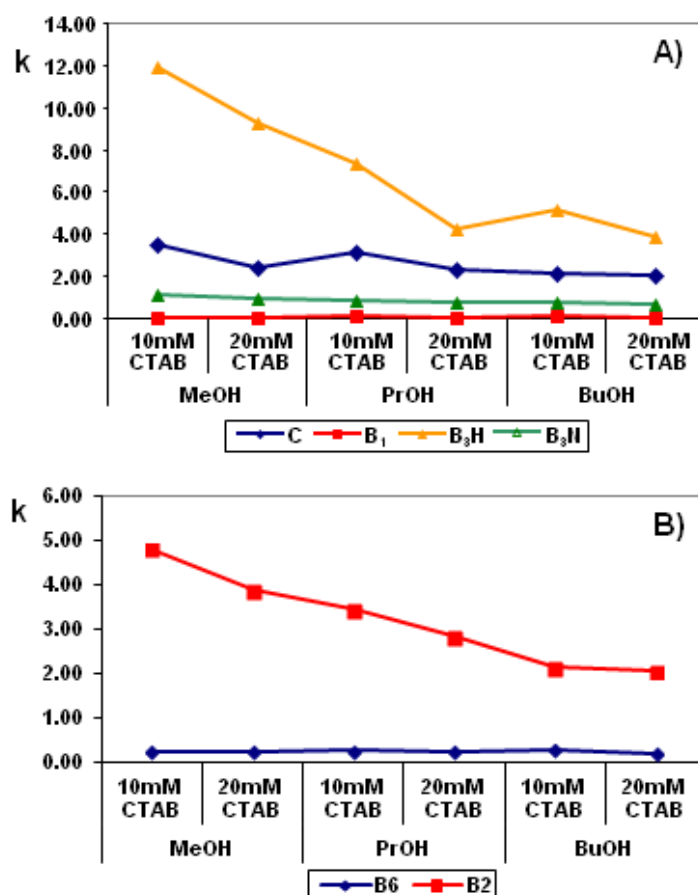


Figura IV.7. Variación del factor de retención, k , en función de la concentración de CTAB en presencia de un 2% de alcohol en la fase móvil H_2SO_4 0.01%/pH 3.5/25°C. A) Detección UV a 254nm. B) Detección FL ($\lambda=290\text{nm}/396\text{nm}$ de 0 a 4 min y 450nm/520nm a partir de 4 min).

Cuando se utiliza la fase móvil CTAB 0.01 M/ H_2SO_4 0.01%/2% MeOH/pH 3.5/25°C se encuentra que la retención de la vitamina B_3H es elevada, mientras que las vitaminas B_1 y B_6 prácticamente se solapan con el tiempo muerto. Para mejorar las condiciones de separación se optimizó de nuevo el pH con la nueva fase móvil. La figura IV.8 muestra la variación de la retención de las vitaminas con el pH con una fase móvil que contiene CTAB 0.01 M.

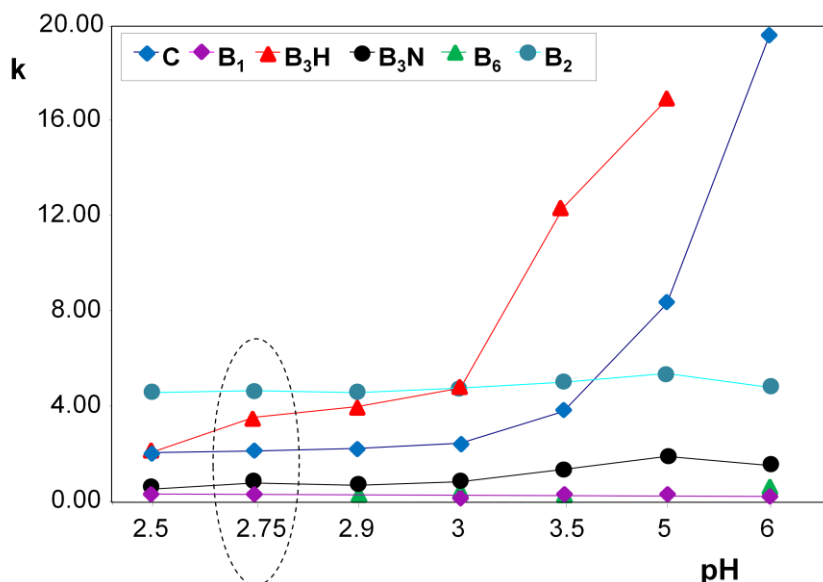


Figura IV.8. Variación del factor de retención con el pH de la fase móvil CTAB 0.01 M/H₂SO₄ 0.01%/2% MeOH/25°C.

Como puede observarse en la figura IV.8, ni la vitamina B₁ ni la vitamina B₆ se retienen en la columna con esta fase móvil, a ningún pH. A pH=5, la vitamina B₃N se retiene algo más que a pHs menores, pero el pico que se obtiene es muy ancho. Las vitaminas C y B₃H son más inestables a este pH, de forma que incluso aparecen dos picos en el caso de la vitamina B₃H, debido a que nos vamos aproximando al valor de su pK_a (4.85). Por tanto con esta fase móvil el pH más adecuado es 2.75, ya que se separan bien 5 vitaminas y el pico cromatográfico del ácido nicotínico corresponde sólo a la forma no ionizada. Las vitaminas B₁ y B₆ no se pueden cuantificar utilizando esta fase móvil, por estar su tiempo de retención muy próximo al tiempo muerto de la columna.

Por tanto, para la determinación de vitaminas incluyendo la vitamina B₂ que no se había podido determinar en ausencia de CTAB, la fase móvil óptima es CTAB 0.01 M/H₂SO₄ 0.01%/2% MeOH/pH 2.75/25°C. El flujo de fase móvil se mantuvo en 0.9 mL/min. En la figura IV.9 se muestra la separación obtenida con esta fase móvil.

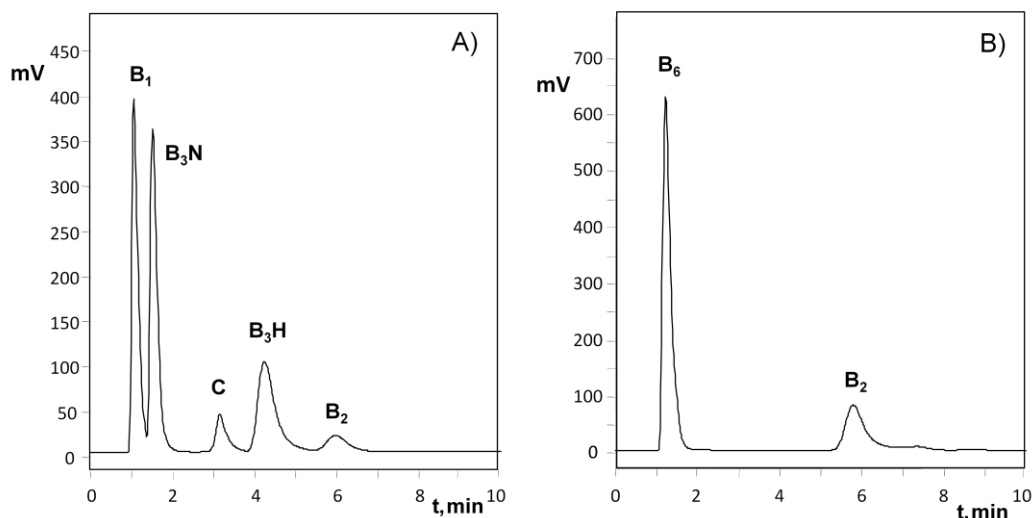


Figura IV.9. Cromatogramas de la separación de 6 vitaminas hidrosolubles de una mezcla patrón con una fase móvil CTAB 0.01 M/H₂SO₄ 0.01%/MeOH 2%/pH 2.75/25 °C. A) Detección ultravioleta a 254 nm y B) Detección de fluorescencia: de 0 a 4 minutos a 290nm/396nm y de 4 a 8 minutos a 450nm/520nm.

Con esta fase móvil se consigue separar en modo isocrático la vitamina B₂ en tan sólo 6 minutos, un tiempo muy corto comparado con los encontrados en la literatura tanto con elución isocrática [Viñas et al., 2004a; Ekinci & Kadakal, 2005] como en gradiente [Moreno & Salvado, 2000; Vidović et al., 2008; Ciulu et al., 2011].

4.3. Características analíticas del método cromatográfico con una fase móvil H₂SO₄ 0.01%/MeOH 2%/pH 3.5/25°C.

La tabla IV.5.A muestra los valores obtenidos para las características analíticas del método cromatográfico con la fase móvil H₂SO₄ 0.01%/MeOH 2%/pH 3.5/25°C, en ausencia de tensioactivo. En esta tabla se encuentra: el tiempo de retención, la sensibilidad, la robustez, el coeficiente de correlación (*r*), los límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ), la repetitibilidad y reproducibilidad tanto del tiempo de retención como del área de pico.

A partir de los valores obtenidos, se puede decir que la sensibilidad es buena en todos los casos y, como era de esperar, mucho mayor para la vitamina B₆ cuando se

detecta por fluorescencia, siendo un orden de magnitud mayor que el resto. Los límites de detección están por debajo de 0.07 mg/L para todas las vitaminas y los de cuantificación por debajo de 0.21 mg/L. Los valores de la precisión son aceptables y en todos los casos menores del 10%.

Con el método cromatográfico en ausencia de tensioactivo se pueden determinar las vitaminas B₁, B₃H, B₃N, B₅ y B₆ en un tiempo de 10 minutos. La única vitamina de las estudiadas que no se puede determinar con este método es la vitamina B₂.

4.4. Características analíticas del método cromatográfico con una fase móvil CTAB 0.01M/H₂SO₄ 0.01%/MeOH 2%/pH 2.75/25°C.

Las características analíticas del método cromatográfico con fase móvil CTAB 0.01M/H₂SO₄ 0.01%/MeOH 2%/pH 2.75/25°C se recogen en la tabla IV.5.B. Cuando se emplea esta fase móvil se pueden determinar las vitaminas C, B₃H, B₃N y B₂. Esta última se determinará con detección de fluorescencia, aunque para comparar los resultados con la detección UV se han determinado las características analíticas en ambos detectores. El resto de vitaminas se determinan con detección UV.

La sensibilidad del método en este caso es buena para todas las vitaminas, aunque en el caso del ácido nicotínico (B₃H) es menor (y por tanto su límite de cuantificación mayor) que en con el método en ausencia de tensioactivo. Por otra parte, como se esperaba para la vitamina B₂, la sensibilidad con detección de fluorescencia es mucho mayor que con detección UV. Los límites de detección son menores de 0.7 mg/L con detección UV y menores que 0.2 mg/L para la vitamina B₂ con detección de fluorescencia. La robustez es menor del 5% en todos los casos, excepto para la vitamina B₂ con detección de fluorescencia cuya RSD es 8%.

Por tanto, a la vista de los valores obtenidos para las características analíticas del método en ausencia y en presencia de CTAB, se determinarán en las muestras de miel todas las vitaminas del grupo B, empleando el método en ausencia de CTAB, a excepción de la vitamina B₂.

Tabla IV.5. Características analíticas de ambos métodos cromatográficos.

A) Fase móvil: H ₂ SO ₄ 0.01 %/MeOH 2% a pH=3.50									
Vitamina	t _R min	r	Sensibilidad L/mg	Robustez, %RSD	LD mg/L	LQ mg/L	Repetibilidad % RSD (t _R /area de pico)	Reproducibilidad %RSD (t _R /area de pico)	
B ₁	2.77	0.9999	28836	4.6	0.055	0.182	0.20/1.2	0.8/8.4	
B ₃ H	3.58	0.9999	53367	2.0	0.048	0.160	0.4/4.3	2.3/5.7	
B ₃ N	7.32	0.9999	29263	6.1	0.067	0.222	0.2/1.7	2.4/2.6	
B ₅	9.79	0.9999	41344	7.3	0.037	0.124	0.1/5.2	0.8/9.1	
B ₆ (*)	4.39	0.9998	854273	7.1	0.063	0.209	0.2/1.7	1.7/8.4	

B) Fase móvil: H ₂ SO ₄ 0.01 %/CTAB 0.01M/MeOH 2% a pH=2.75									
B ₂	5.67	0.9986	51169	3.5	0.43	1.42	0.10/0.88	1.51/8.48	
B ₃ H	4.59	0.9985	33136	3.9	0.38	1.27	1.97/1.53	3.72/2.99	
B ₃ N	1.43	0.9997	34560	1.3	0.63	2.11	1.21/1.34	1.05/4.70	
C	2.97	0.9981	37832	2.6	0.64	2.13	0.19/0.35	4.16/3.76	
B ₂ (*)	5.86	0.9983	411030	8.0	0.15	0.49	0.45/1.49	1.49/8.84	

4.5. Determinación de vitaminas hidrosolubles del grupo B en mieles por RP-HPLC en ausencia y en presencia de CTAB en la fase móvil.

El método cromatográfico tanto en ausencia como en presencia de CTAB, se ha utilizado para el análisis de vitaminas del grupo B en las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha estudiadas en esta tesis doctoral. Se analizaron 5 muestras diferentes de cada tipo floral (castaño, espliego, romero, tomillo, viborera) y también mielatos, producto de composición diferente a la miel de néctar, cuya composición vitamínica nunca ha sido descrita en la bibliografía. La confirmación de que los picos corresponden a esas vitaminas, se realizó adicionando pequeñas cantidades de los patrones de las vitaminas, como se muestra en la figura IV.10 para una muestra de miel de castaño con detección UV y la fase móvil en presencia de CTAB.

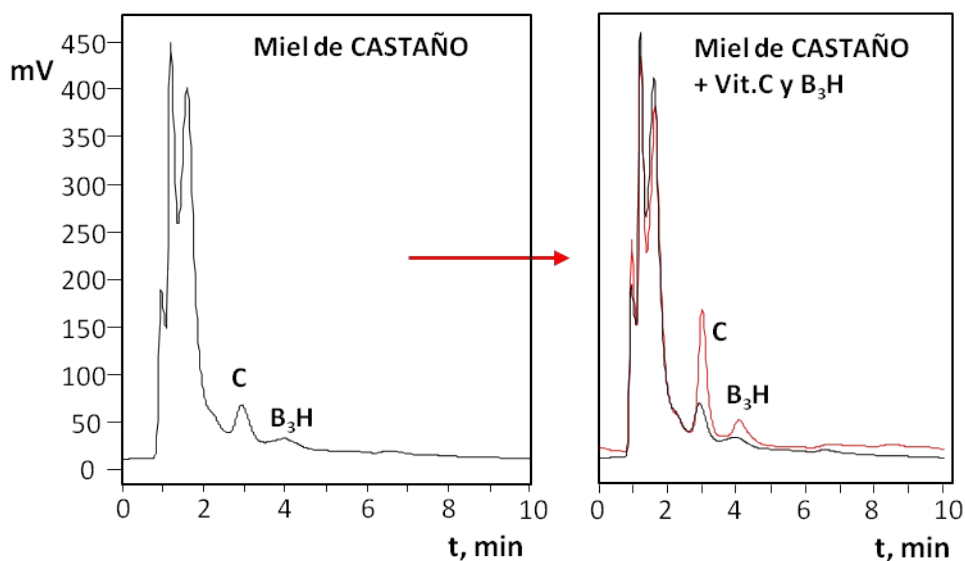


Figura IV.10. Cromatograma de una muestra de miel de castaño. Fase móvil CTAB 0.01M/H₂SO₄ 0.01%/MeOH 2%/pH 2.75/25⁰C. Detección UV a 254 nm.

En la figura IV.11 se muestran los cromatogramas obtenidos para una muestra de viborera con la fase móvil en ausencia CTAB con detección UV y de fluorescencia.

La figura IV.12 muestra los cromatogramas de otras 2 muestras de miel, castaño y mielato, con la fase móvil en presencia de tensioactivo y detección, tanto UV como de fluorescencia, en las que se encontró la vitamina B₂.

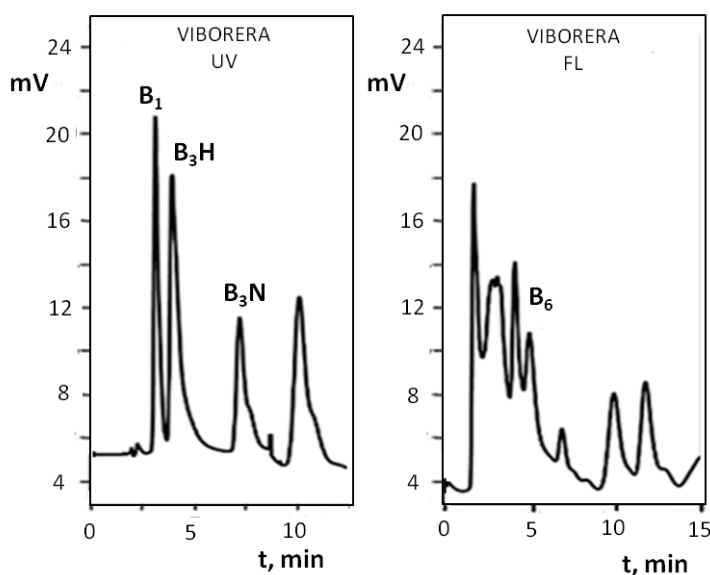


Figura IV.11. Cromatogramas de una muestra de miel de viborera. Fase móvil H₂SO₄ 0.01%/MeOH 2%/pH 3.75/25⁰C con detección UV y de fluorescencia

Los resultados de las vitaminas encontradas en las mieles vienen recogidos en la tabla IV.5. Como se observa en esta tabla, las vitaminas encontradas, así como su cantidad, es diferente entre muestras dentro del mismo tipo de miel, lo que indicaría que el contenido vitamínico no está totalmente relacionado con el origen botánico.

Los resultados de las vitaminas encontradas en las mieles vienen recogidos en la tabla IV.6. Como se puede observar en esta tabla, las vitaminas encontradas, así como su cantidad, es diferente entre muestras dentro del mismo tipo de miel, lo que indicaría que el contenido vitamínico no está totalmente relacionado con el origen botánico.

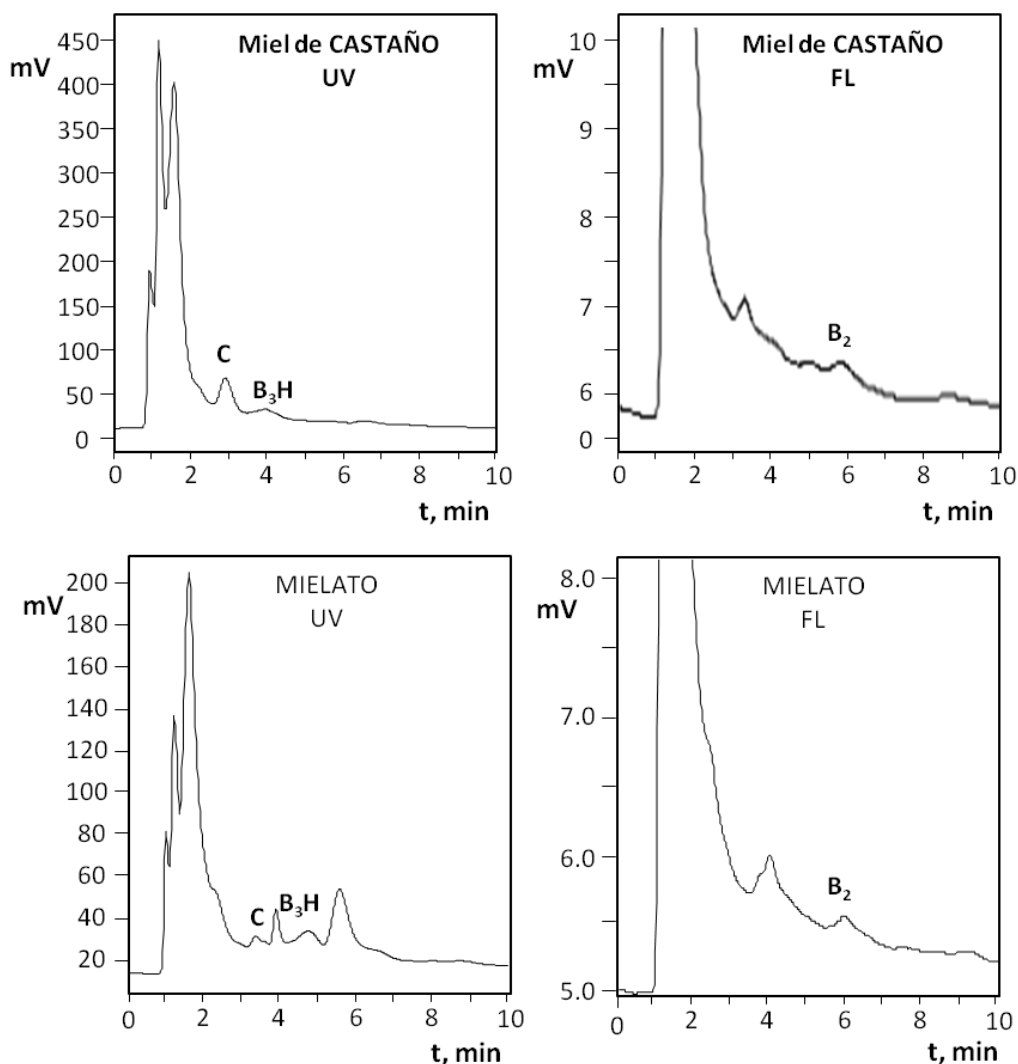


Figura IV.12. Cromatogramas de muestras de miel de castaño y mielato. Fase móvil CTAB 0.01M/H₂SO₄ 0.01%/MeOH 2%/pH 2.75/25°C con detección UV y de fluorescencia.

La concentración de vitamina C no se ha recogido en esta tabla, ya se presentaron los resultados en el capítulo III de esta memoria (tabla III.2). Esta vitamina está presente en todas las muestras de las variedades de miel estudiadas.

Tabla IV.6. Cantidades de vitaminas del grupo B en todas las muestras analizadas. Todas las vitaminas por el método cromatográfico sin tensoactivo, excepto la vitamina B₂, que se determina por el método con CTAB.

FASE MÓVIL		H ₂ SO ₄ 0.01% / MeOH 2% pH = 3.5					H ₂ SO ₄ 0.01% / MeOH 2% / CTAB 0.01M pH = 2.75
TIPO DE MIEL	MUESTRA	B ₁ (mg/100g)	B ₃ H (mg/100g)	B ₃ N (mg/100g)	B ₅ (mg/100g)	B ₆ (mg/100g)	B ₂ (mg/100g)
Romero	R9	ND	ND	NQ	ND	ND	ND
	R3	ND	0.59 ± 0.04	0.09 ± 0.01	ND	0.155 ± 0.006	ND
	R4	ND	0.55 ± 0.02	0.09 ± 0.01	ND	NQ	ND
	R5	NQ	ND	0.07 ± 0.01	ND	NQ	ND
	R2	NQ	0.09 ± 0.01	ND	ND	NQ	ND
Espiego	E9	0.03 ± 0.01	0.31 ± 0.02	ND	ND	ND	ND
	E2	NQ	0.27 ± 0.05	NQ	ND	NQ	ND
	E3	0.91 ± 0.09	1.0 ± 0.1	ND	0.28 ± 0.04	NQ	ND
	E4	0.08 ± 0.01	ND	NQ	ND	NQ	ND
	E5	NQ	0.37 ± 0.03	0.28 ± 0.01	ND	NQ	ND
Tomillo	T10	3.2 ± 0.2	0.192 ± 0.001	ND	0.27 ± 0.06	0.023 ± 0.002	ND
	T1	2.3 ± 0.2	ND	ND	0.23 ± 0.05	0.0224 ± 0.0009	ND
	T2	11.5 ± 0.3	0.77 ± 0.02	ND	0.64 ± 0.06	NQ	ND
	T23	31 ± 1	0.40 ± 0.01	NQ	0.34 ± 0.04	ND	ND
	T22	10.7 ± 0.8	1.53 ± 0.08	ND	-	NQ	ND

Tabla IV.6. (Continuación)

FASE MÓVIL		H_2SO_4 0.01% / MeOH 2% pH = 3.5					H_2SO_4 0.01% / MeOH 2% / CTAB 0.01M pH = 2.75
TIPO DE MIEL	MUESTRA	B ₁ (mg/100g)	B ₃ H (mg/100g)	B ₃ N (mg/100g)	B ₅ (mg/100g)	B ₆ (mg/100g)	B ₂ (mg/100g)
Viborera	V8	0.26 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.01	ND	0.043 ± 0.004	ND
	V5	0.25 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.02	ND	NQ	ND
	V7	2.1 ± 0.2	0.57 ± 0.04	1.18 ± 0.08	ND	ND	ND
	V11	4.2 ± 0.4	0.67 ± 0.02	2.28 ± 0.03	ND	NQ	NQ
	V4	1.96 ± 0.06	0.36 ± 0.00	0.72 ± 0.03	ND	NQ	NQ
Mielato	M1	0.4 ± 0.1	0.11 ± 0.04	0.01 ± 0.00	ND	NQ	0.0016 ± 0.0001
	M2	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.80 ± 0.04	ND	ND	NQ
	M3	2.2 ± 0.1	1.48 ± 0.06	1.13 ± 0.06	ND	ND	NQ
	M4	3.1 ± 0.3	0.05 ± 0.00	1.16 ± 0.07	ND	ND	NQ
	M5	1.6 ± 0.1	2.0 ± 0.2	0.54 ± 0.05	ND	NQ	NQ
Castaño	C5	0.97 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.07 ± 0.01	ND	ND	NQ
	C3	0.20 ± 0.01	5.2 ± 0.2	0.33 ± 0.03	ND	NQ	NQ
	C4	2.6 ± 0.2	5.1 ± 0.6	NQ	1.4 ± 0.2	NQ	NQ
	C2	3.2 ± 0.3	4.0 ± 0.1	NQ	0.56 ± 0.06	ND	NQ
	C1	1.31 ± 0.09	3.5 ± 0.2	0.71 ± 0.00	ND	NQ	NQ

NQ = No cuantificado (por debajo del límite de cuantificación del método).

ND = No detectado (por debajo del límite de detección del método).

La vitamina B₁ está presente en casi todas las mieles analizadas, 27 de las 30 muestras. También están en gran cantidad de muestras el ácido nicotínico (B₃H) que aparece en 26 de 30 muestras y la nicotinamida (B₃N) en 23 de 30 de muestras. El ácido pantoténico (B₅) aparece en muy pocas y solo se ha determinado en 7 de las 30 muestras analizadas. En cuanto a la piridoxina (B₆) se detecta en más de la mitad de las muestras, pero las cantidades en las que se presenta son tan bajas, que en la mayoría de ellas, no se pudieron cuantificar. Por último, la riboflavina (B₂), al igual que la piridoxina, es apenas detectable y se presenta, mayoritariamente, en las mieles oscuras (castaño y mielato).

Por tipo de miel, un resumen de las vitaminas que aparecen en cada tipo:

- **Romero:** contienen las vitaminas B₁, B₃H, B₃N y B₆, aunque no en todas las muestras. No aparece en ninguna muestra ni la vitamina B₂ ni la B₅.
- **Espliego:** todas las muestras contienen vitamina B₁. Aparecen las vitaminas B₃H, B₃N, B₅ y B₆, pero no en todas las muestras. No se detecta la B₂.
- **Tomillo:** tiene un comportamiento muy similar a las mieles anteriores: todas las muestras contienen la vitamina B₁, aparecen B₃H, B₃N, B₅ y B₆, pero no en todas las muestras y no se detecta B₂.
- **Viborera:** se encuentran las vitaminas B₁, B₃H y B₃N. En algunas muestras aparecen las vitaminas B₆ y B₂. No se detecta la B₅.
- **Mielato:** se encuentran las vitaminas B₁, B₂, B₃H y B₃N en todos los mielatos analizados. En algunas muestras aparece la vitamina B₆. No se detecta la vitamina B₅.
- **Castaña:** se encuentran las vitaminas B₁, B₂, B₃H y B₃N en todas las muestras sin excepción. En algunas aparecen las vitaminas B₅ y B₆.

En la tabla IV.7 se muestra el contenido vitamínico medio de las mieles monoflorales estudiadas y su comparación con la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) para cada vitamina. Como puede observarse, la vitamina B₁ está en concentraciones muy elevadas con respecto a su CDR en la mayoría de las variedades de miel estudiadas, excepto en las de romero. Tanto en las mieles de tomillo como las de viborera, castaña y mielato se rebasa, con creces, el 30% de la CDR, lo que implica que estas mieles poseen un “alto contenido en tiamina”. Muy llamativo es el caso de la miel de tomillo con un valor medio 10 veces superior a la CDR. Si analizamos los

resultados muestra por muestra de miel de tomillo (ver tabla IV.6), se observa que todas las muestras analizadas, al menos contienen el doble de la CDR por 100 g y una miel que supera en 30 veces dicha CDR. Esto denota una gran dispersión de resultados pero también un valor mínimo de vitamina B₁ elevado en todas las muestras. El resto de mieles con “alto contenido en tiamina” también contienen concentraciones muy elevadas de esta vitamina, tan altas que incluso con una cucharada de miel sería suficiente para obtener la cantidad recomendada de tiamina por día. Al igual que en las mieles de tomillo, la dispersión de resultados es elevada, pero también en todas las mieles, sin excepción se rebasa la CDR. Las mieles de espliego no contienen concentraciones tan elevadas pero, aún así, tienen niveles de “fuente de vitamina B₁”.

En el caso de la vitamina B₃H sólo la media de las mieles castaño supera el umbral del 15% de la CDR, pudiendo denominarse “fuente” de esta vitamina. El resto de variedades de miel contienen esta vitamina pero en concentraciones bajas. El otro vitámero de niacina, B₃N, también aparece en la mayoría de las muestras pero en cantidades menores de este porcentaje mínimo (15% CDR) en todos los tipos de miel. Incluso, si se suman las concentraciones de ambos vitámeros de niacina tampoco se llega a ese umbral del 15% de la CDR, con la excepción de las mieles de castaño.

Las mieles de castaño tienen una media alta de vitamina B₅, pero hay que tener en cuenta que en 3 de las 5 mieles estudiadas no se ha detectado, por lo que no se puede decir que sea representativo de este tipo de miel.

No ha sido posible comparar los resultados obtenidos de las vitaminas del grupo B en las mieles estudiadas con datos de la bibliografía. En primer lugar, como se observa en la tabla IV.3 hay muy pocos estudios sobre el tema. En segundo lugar, bien el tipo de miel, origen botánico, se corresponde muy poco con las mieles investigadas de Castilla-La Mancha, o bien las vitaminas estudiadas por otros investigadores no se detectan o no se pueden cuantificar.

Tabla IV.7. Valores medios de concentración de vitaminas hidrosolubles del grupo B en las mieles de Castilla-La Mancha y porcentaje que corresponde de la CDR por 100g y por cucharada de miel (21 g). CDR (B₁) = 1.1 mg, CDR (B₂) = 1.4 mg, CDR (B₃) = 16 mg, CDR (B₅) = 6 mg, CDR (B₆) = 1.4 mg.

TIPO DE MIEL	[B ₁], mg/100g	Mínimo- Máximo	% CDR, por 100g/21g	[B ₃ H], mg/100g	Mínimo- Máximo	% CDR, por 100g/21g	[B ₃ N], mg/100g	Mínimo- Máximo	% CDR, por 100g/21g
Romero	NQ	ND - NQ	-	0.41	ND - 0.59	2.6/0.5	0.08	ND - 0.09	0.5/0.1
Espliego	0.2	NQ - 0.91	18.5/3.9	0.48	ND - 0.98	3.0/0.6	0.28	ND - 0.28	1.7/0.3
Tomillo	11.7	2.3 - 30	1067.3 ² /224.1	0.72	ND - 1.53	4.5/0.9	NQ	ND - NQ	-
Viborera	1.75	0.25 - 4.21	159.1 ² /31.8	0.36	0.05 - 0.67	2.2/0.4	0.87	0.02 - 2.28	5.4/1.1
Mielato	1.71	0.40 - 3.12	154.5 ² /30.9	0.95	0.05 - 2.05	5.9/1.2	0.73	0.01 - 1.16	4.6/0.8
Castaño	1.67	0.20 - 3.24	151.8 ² /30.4	3.63	0.04 - 5.17	22.7 ¹ /4.5	0.37	NQ - 0.71	2.3/0.5

¹ Concentración superior al 15% de la CDR (por 100g de miel), por lo que se podría etiquetar el producto como "fuente de vitamina..." [DOUE L 404/9 de 30 de diciembre 2006].

² Concentración superior al 30% de la CDR (por 100g de miel), por lo que se podría etiquetar el producto como "alto contenido de vitamina..." [DOUE L 404/9 de 30 de diciembre 2006].

Tabla IV.7. (Continuación)

TIPO DE MIEL	[B ₅], mg/100g	Mínimo - Máximo	% CDR, por 100g/21g	[B ₅], mg/100g	Mínimo - Máximo	% CDR, por 100g/21g	[B ₂], mg/100g	Mínimo - Máximo	% CDR, por 100g/21g
Romero	ND	-	-	0.155	ND - 0.155	11.1/2.2	ND	-	-
Espliego	0.28	ND - 0.28	4.7/0.9	NQ	ND - NQ	-	ND	-	-
Tomillo	0.37	ND - 0.64	6.2/1.2	0.02	ND - 0.022	1.4/0.3	ND	-	-
Viborera	ND	-	-	0.04	ND - 0.044	2.8/0.6	NQ	ND - NQ	-
Mielato	ND	-	-	NQ	ND - NQ	-	0.0165	NQ	1.2/0.2
Castaño	1.01	ND - 1.45	16.8 ¹ /3.4	NQ	ND - NQ	-	NQ	NQ	-

¹ Concentración superior al 15% de la CDR (por 100g de miel), por lo que se podría etiquetar el producto como "fuente de vitamina..." [DOUE L 404/9 de 30 de diciembre 2006].

² Concentración superior al 30% de la CDR (por 100g de miel), por lo que se podría etiquetar el producto como "alto contenido de vitamina..." [DOUE L 404/9 de 30 de diciembre 2006].

Cabe señalar que Viñas et al. [2001] encontraron una cantidad de vitamina B₁ de 0.74 mg/100 g en mieles de castaño, cantidad inferior a la obtenida para las mieles de Castilla-La Mancha, y que Tuberoso et al. [2012] determinaron vitamina B₂ en mielatos de castaño con valores comprendidos entre 0.12 y 0.61 mg/100 g, cantidades superiores a las obtenidas para ese tipo de miel en esta Memoria.

La detección de ácido nicotínico en la práctica totalidad de las mieles estudiadas, está en concordancia con los resultados presentados por Ciulu et al. [2011], que también encuentran esta vitamina en casi todos los tipos de miel estudiados.

5. CONCLUSIONES

1. La separación cromatográfica de las vitaminas B₁, B₃H, B₃N, B₅, B₆ y C se puede llevar a cabo con una fase móvil acuosa H₂SO₄ 0.01%/pH 3.5/25^oC en modo isocrático. Además, la adición de un alcohol de cadena corta como metanol a la fase móvil en un 2% v/v reduce significativamente el tiempo de análisis.
2. La presencia del tensioactivo catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) en la fase móvil en una concentración de 0.01 M permite determinar la vitamina B₂ sin necesidad de utilizar un gradiente de elución. La combinación de las fases móviles H₂SO₄ 0.01%/MeOH 2%/pH 3.5/25^oC y CTAB 0.01M/H₂SO₄ 0.01%/pH 2.75/25^oC en modo isocrático, permite la separación de 7 vitaminas hidrosolubles: B₁, B₂, B₃H, B₃N, B₅, B₆ y C.
3. Ambos métodos cromatográficos se han aplicado para la determinación de las vitaminas del grupo B de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.
 - La vitamina B₁ se encuentra en la práctica totalidad de las mieles estudiadas. Las mieles de viborera, castaño, tomillo y mielato poseen un “alto contenido en vitamina B₁”.
 - La vitamina B₂ se encuentra en las mieles más oscuras, mielato y castaño, pero en concentraciones muy bajas.
 - La niacina, B₃H y B₃N, se encuentran en la mayor parte de las mieles analizadas pero en concentraciones bajas respecto a la CDR.

- La vitamina B₅ aparece en muy pocas muestras y únicamente en las mieles de tomillo está en todas las muestras analizadas
- La vitamina B₆ se ha encontrado en todos los tipos de miel, pero no en todas las muestras y sus concentraciones son muy bajas.

Los resultados recogidos en este capítulo han dado lugar a la siguiente publicación:

Analysis of Water-Soluble Vitamins in Honey by Isocratic RP-HPLC

Virginia León-Ruiz & Soledad Vera & Amelia V. González-Porto & María Paz San Andrés

Food Analytical Methods, 6, 2013, 488–496

Analysis of Water-Soluble Vitamins in Honey by Isocratic RP-HPLC

Virginia León-Ruiz · Soledad Vera ·
Amelia V. González-Porto · María Paz San Andrés

Received: 18 May 2012 / Accepted: 3 July 2012 / Published online: 26 July 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract An isocratic RP-HPLC method has been developed for the identification and quantification of water-soluble vitamins in honey. The mobile phase tested was an aqueous solution of sulphuric acid and the detection was carried out simultaneously by UV and fluorescence. The separation of vitamins C (L-ascorbic acid), B₁ (thiamine), B₃N (nicotinamide), B₃H (nicotinic acid), B₅ (D-pantothenic acid) and B₆ (pyridoxine) is achieved in these conditions in 15 min. The addition to the mobile phase of methanol 2 %v/v reduced significantly the analysis time in the separation of these vitamins up to 10 min. Moreover, in presence of a cationic surfactant hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) in the mobile phase, the separation of vitamin C, B₁, B₃N, B₃H, B₂ (riboflavin) and B₆ is possible in 6 min. The combination of both mobile phases, H₂SO₄/methanol and H₂SO₄/methanol/CTAB, has been applied to the analysis, in isocratic mode, of several monofloral honeys (rosemary, thyme, lavender, chestnut, echium) and a honeydew honey in a short time analysis.

Keywords Water-soluble vitamins · Honey · HPLC · Cationic surfactant · CTAB

Introduction

Honey is the natural sweet substance produced by *Apis mellifera* bees from the nectar of plants, the living parts of plants secretions or the excretions of plant-sucking insects on the living parts of plants. The bees collect and transform these secretions by combining with specific substances of their own. Next, they deposit, dehydrate, store and leave them in honeycombs to ripen and mature (European Union 2001). Honey contains at least 181 substances; it is a supersaturated solution of sugars and their content of water is about 18 %. Other minor components are minerals, organic acids, proteins, free amino acids, enzymes, flavonoids, phenolic acids and vitamins (White 1979; Sato and Miyata 2000; Bogdanov et al. 2004; Álvarez-Suárez et al. 2010; Lachman et al. 2010).

At present, there is an increasing commercial interest to produce unifloral honeys due to the therapeutic uses of certain honey varieties. It would be important for the customers to have nutritional information of honey on the label, which is regulated for all foodstuffs by European Community (European Union 1990, 2001, 2006, 2008).

The vitamin's content in honey is mainly water soluble due to its aqueous nature containing a high quantity of sugars and a low percentage of lipids. Vitamin C has been specially determined in honey because of its antioxidant effect (Castro et al. 2001; Gheldof et al. 2002; Hayakawa et al. 2008; León-Ruiz et al. 2011) and it is often found in almost all honeys. Only Casella and Gatta (2001) in one orange honey sample, Álvarez-Suárez et al. (2010a, b) in six honey samples and Castro et al. (2001), in spite of a high number of honeys studied, did not detect the presence of ascorbic acid in any sample. Vitamin C analysis is one of the indicators more often used to give the nutritional quality of a food since it is very vulnerable to chemical and enzymatic oxidation, accelerated further by factors such as light, oxygen or heat.

In the last 10 years, very few references appear on the determination of vitamins in honeys, and the analytical

V. León-Ruiz · S. Vera · M. P. San Andrés (✉)
Analytical Chemistry Department, Faculty of Chemistry,
University of Alcalá,
Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33,6,
28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain
e-mail: mpaz.sanandres@uah.es

V. León-Ruiz · A. V. González-Porto
Beekeeping Research Centre,
C/ Extramuros, s/n,
19180 Marchamalo, Guadalajara, Spain

methods have been developed for the determination of only one specific vitamin or a few of them. Anyway, it is not possible to find a determination of all water-soluble vitamins in honey with the same analytical method. In fact, Viñas et al. (2004a, b) have determined the different structures of vitamin B₆ and vitamin B₂. Vitamin B₆, as pyridoxine, is detected in one eucalyptus honey and in another multifloral honey at levels lower than 0.021 mg/100 g. Vitamin B₆ was not detected in rosemary or orange blossom honey. On the other hand, vitamin B₂, as riboflavin, is detected in chestnut tree honey, eucalyptus, cane and multifloral at levels up to 0.074 mg/100 g.

Ciulu et al. (2011) have determined vitamins C, B₂, B₃, B₅ and B₉. However, in this work, neither vitamin B₁ nor vitamin B₆, which often appears in some honeys, was not analysed. They have developed a RP-HPLC gradient mode to determine five water-soluble vitamins in honeys, with an analysis time of 18 min. The presence of vitamin B₃H was detected in all samples analysed, but in some of them the concentration was under its limit of detection. Vitamin B₉ and vitamin B₂ were quantified in about half of the samples, and vitamin B₅ seems to be much less common than the other vitamins.

The aim of this work is the study of the vitamin's composition of the Protected Denomination of Origin *La Alcarria Honey* (multifloral, rosemary and lavender) located in central Spain, using a fast and simple chromatographic method working in isocratic mode. The quantification of the vitamins content in different honeys allows their characterisation in function of their types and the discrimination between them which is very important in the quality controls of honey. Other interesting honeys which are not into the Denomination *La Alcarria Honey*, as chestnut, echium and thyme, have also been studied.

Materials and Methods

Reagents and Solutions

All reagents were of analytical grade. The reagents were D-pantothenic acid, L-ascorbic acid and nicotinamide (Fluka, Madrid, Spain); folic acid, nicotinic acid, pyridoxine hydrochloride, thiamine hydrochloride and riboflavin (Sigma, Barcelona, Spain); *n*-butanol, ethanol, methanol and *n*-propanol (Scharlab, Barcelona, Spain); hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Merck, Darmstadt, Germany); polyoxyethylene(23)lauryl ether (Brij-35) (Aldrich Madrid, Spain), sulphuric acid (Merck, Darmstadt, Germany) and ortho-phosphoric acid (Panreac, Barcelona, Spain).

Standard solutions of thiamine (B₁), nicotinamide (B₃N), nicotinic acid (B₃H), D-pantothenic acid (B₅), pyridoxine (B₆) and L-ascorbic acid (C) were dissolved in ultra-pure water. Riboflavin (B₂) was dissolved in acid media (0.5 mL

of H₃PO₄ conc. in 25 mL ultra-pure water) and the folic acid (B₉) in alkali media (0.2 mL of NaOH 0.1 M in 25 mL ultra-pure water). All solutions were stored in darkness at 4 °C.

Equipment

The chromatographic system used is equipped with a pump model 250 (Perkin-Elmer), a thermostatic oven Jet-Stream Plus (Knauer), 20-μL injection valve (Rheodyne) and two detectors: a programmable UV/VIS detector model 785A (Applied Biosystems) and a fluorescence detector 200 (Perkin-Elmer). An interface 950 (Perkin-Elmer) was used to transfer data to the computer. Two chromatographic columns μBondapak C₁₈ 10 μm, 150×3.9 mm from Waters were used. One of them was previously saturated with CTAB. Mobile phase flow was 0.9 mL/min.

The pH measures were realised in a pH-meter model 781 pH/Ion Meter from Metrohm.

Mobile Phase Selection

Firstly, a simple mobile phase was prepared with H₂SO₄ 0.01 % (v/v) at pH 2.5. The next mobile phases were obtained from this one but modifying different parameters: pH (ranged between 2.5 and 3.7), temperature (ranged between 25 °C and 40 °C) and finally by addition of a low percentage of a short chain alcohol as methanol (MeOH), ethanol (EtOH), *n*-propanol (*n*-PrOH) and *n*-butanol (*n*-BuOH). The alcohol percentages were varied from 1 % to 10 % (v/v).

In a second study, a surfactant was added to the mobile phase to improve the separation. The surfactants tested were one non-ionic (polyoxyethylene-23-lauryl ether, Brij 35) at a concentration of 5 mM and in presence of methanol 2 % (v/v) and another cationic (hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB) at concentrations ranging between 10⁻⁴ and 0.02 M, lower and higher than its critical micellar concentration. The separation was studied also in presence of MeOH, *n*-PrOH and *n*-BuOH ranged between 1 % and 10 % (v/v).

Analytical Features

The analytical features of the chromatographic method were determined for the mobile phase in absence of CTAB [H₂SO₄ 0.01 %/MeOH 2 % (v/v) at pH 3.5 and 25 °C] and in presence of the surfactant [H₂SO₄ 0.01 %/CTAB 0.01 M/MeOH 2 % (v/v) at pH 2.75 and 25 °C]. In both cases, the analytical characteristics of the chromatographic method were obtained ranging the water-soluble vitamins concentrations from 0.05 to 10.0 mg/L (thiamine and pantothenic acid), 0.025 to 10.0 mg/L (pyridoxine), 2×10⁻³ to 62 mg/L (riboflavin), 0.2 to 100 mg/L (nicotinamide and nicotinic acid) and 0.1 to 800 mg/L (vitamin C). The analytical wavelength in UV detection was 254 nm changing to 200 nm at 7.5 min for the

detection of vitamin B₅. Fluorescence detection wavelengths for vitamin B₆ and vitamin B₂ were 290/396 nm and 450/520 nm excitation/emission, respectively.

The validation of the chromatographic method has been realised and the validation analytical parameters estimated for all vitamins.

The calibration method, fitting peak area with the quantity of vitamin injected, was used to determine the sensitivity, limit of detection and limit of quantification. The sensitivity of the method was defined as the slope of calibration graph. The limit of detection, LOD, was calculated as the amount of vitamin that yields a signal equal to three times the standard deviation of intercept, s_a . The same definition was used for the limit of quantification, LOQ, adding ten times the s_a value (Miller and Miller 2005). The robustness was calculated as the relative standard deviation (RSD) corresponding to the slope of the calibration curve measured in four different days.

Finally, precision of retention time and peak area of each vitamin was determined by means of repeatability and reproducibility measures. In all cases, precision was expressed in terms of relative standard deviation, RSD.

The accuracy of the method was evaluated by the addition of a known quantity of B group vitamins standards to the honey samples and calculating the difference between its content in absence and in presence of the standard. The recovery is given in percentage. In the case of vitamin C, the accuracy was determined by comparison with an official method.

Vitamin Determination in Honey Samples

The honey samples analysed in this study were one honeydew and six monofloral honeys. The honey type of nectar samples were as follows: two thyme honeys (*Thymus vulgaris* L.), one rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), one chestnut (*Castanea sativa* Mill.), one lavender (*Lavandula latifolia* L.) and one echium (*Echium vulgare* L.). All honeys were directly provided by the beekeepers and had not been industrially processed. They were stored at -20°C until analysis.

Samples were prepared by dissolving an amount between 5 g and 15 g of honey in 25 mL of ultra-pure water, and filtered through a nylon syringe filter of 0.45 μm prior to their injection in the chromatographic system. The vitamins B₁, B₃H, B₃N, B₅ and B₆ were analysed using the mobile phase H₂SO₄ 0.01 %/MeOH 2 % (v/v) at pH 3.5 and 25 $^{\circ}\text{C}$, and vitamins C and B₂ were analysed with the mobile phase H₂SO₄ 0.01 %/CTAB 0.01 M/MeOH 2 % (v/v) at pH 2.75 and 25 $^{\circ}\text{C}$.

Results and Discussion

This work has been developed to separate water-soluble vitamins in honey samples with a chromatographic method in isocratic mode as a fast way to be used in quality control

of honeys. The chromatographic method should separate the water-soluble vitamins with a good resolution in the shortest time possible.

The first mobile phase used was H₂SO₄ 0.01 % (v/v)/pH=2.5 at 25 $^{\circ}\text{C}$, which had been utilised by our research group in the determination of vitamin C in honeys (León-Ruiz et al. 2011), and its possibilities were investigated in the separation of B complex vitamins. This mobile phase in the experimental conditions mentioned above gives a poor separation of vitamins C, B₁, B₃N, B₃H, B₅ and B₆, with bad resolution between the different peaks. In addition, vitamins B₂ and B₉ are not being eluted in a reasonable analysis time. In the case of vitamin B₂, this fact has high importance due to its usual presence in honey types. From these results, the mobile phase was modified to improve the vitamin separation.

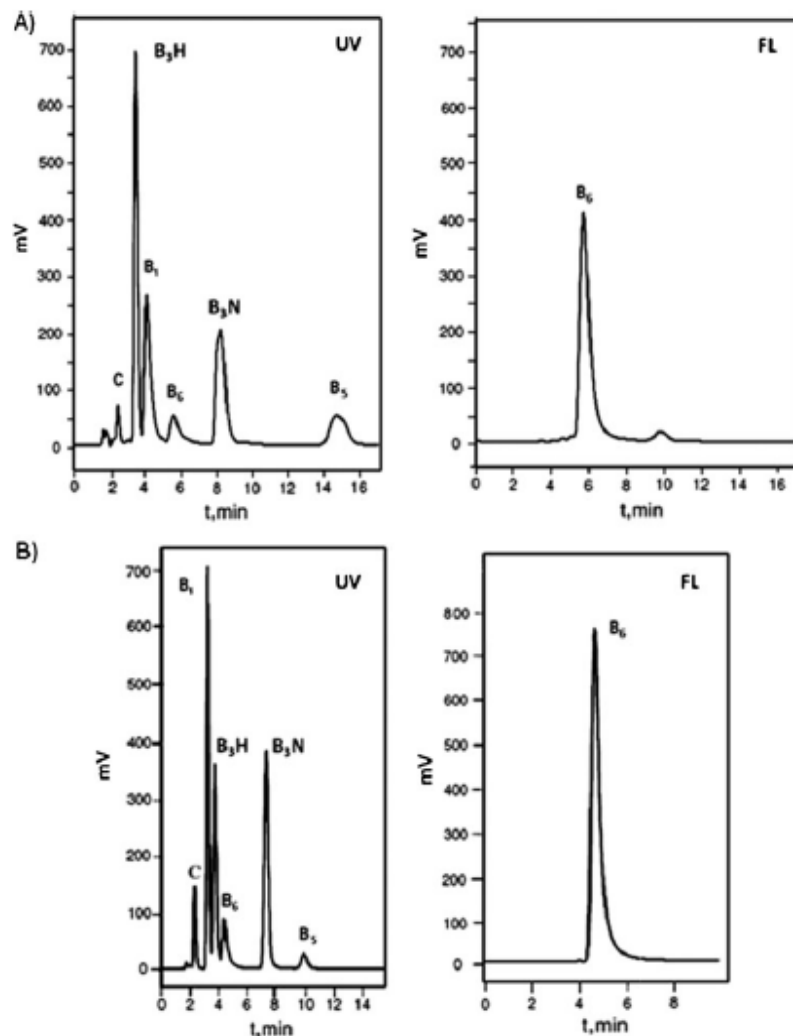
Influence of pH, Temperature and the Addition of a Short-Chain Alcohol to a Mobile Phase H₂SO₄ 0.01 % (v/v)

In order to achieve the separation of the vitamins reducing the retention time of vitamins B₂ and B₉, the influence of pH and temperature was studied on the chromatographic separation.

The pH has been varied between 2.5 and 3.7 values. The vitamins have very different chemical structures, and for this reason the influence of pH is very different over each one. In some case, such as the pairs B₁–B₃H and B₃N–B₆, the elution order is reversed around 3.2 and 3.0, respectively. From the differences observed in the retention factors for each vitamin as a function of pH, the best separation conditions are obtained at pH=3.5. Once the value of pH was setting, the temperature was varied between 25 and 45 $^{\circ}\text{C}$. As it is expected, an increase in temperature produces a decrease in the retention times of vitamins. When the temperature reaches high values, the chromatographic peaks corresponding to nicotinic acid (B₃H) and thiamine (B₁) lose resolution, and they are overlapping completely at 40 $^{\circ}\text{C}$. For this reason, and taking into account that an increase in temperature would produce the degradation of vitamins, 25 $^{\circ}\text{C}$ was selected in the rest of the work.

Therefore, the mobile phase H₂SO₄ 0.01 M/pH 3.5 at 25 $^{\circ}\text{C}$ provides the separation of six water-soluble vitamins in 16 min. The chromatogram of this separation is shown in Fig. 1a. The analysis time is lower than those reported before in isocratic mode with hydro-organic mobile phases (Ekinci and Kadakal 2005) or by Micellar Liquid Chromatography in presence of SDS/*n*-pentanol (Monferrer-Pons et al. 2003; Capella-Peiró et al. 2004). Nevertheless, using this mobile phase, it is not possible to elute the vitamins B₂ and B₉ in a short time lower than 30 min since these vitamins are the most hydrophobic of the water-soluble vitamins and they have a long retention at any pH and temperature if a low content of

Fig. 1 Chromatographic separation of vitamins a with a mobile phase H_2SO_4 0.01 %, pH=3.5 at 25 °C and b with a mobile phase H_2SO_4 0.01 %/MeOH 2 %, pH=3.5 at 25 °C with UV and fluorescence detection in each case



organic modifier is used in the absence of a surfactant. For this reason, in Fig. 1 these vitamins are not separated.

In the next step in this study, when a short-chain alcohol (MeOH, EtOH, *n*-PrOH and *n*-BuOH) is added to the mobile phase, *n*-butanol is the only one that allows the elution of vitamin B_2 in a short time with 8.3 %v/v, but the peaks of the other six vitamins are overlapped at a column dead time. The best improvement in the separation with the other alcohols between 2 % and 10 %v/v is obtained in the presence of 2 %v/v MeOH. The chromatogram is obtained with the alcohol in a shorter analysis time (10 min versus 15 min) with good resolution as it is shown in Fig. 1b. It is also important to indicate the change in the elution order of thiamine (B_1) and nicotinic acid (B_3H), produced by the presence of methanol in the mobile phase with respect to its absence. On the other hand, the pantothenic acid

molecule (vitamin B_5) does not contain a characteristic chromophore group and hence it exhibits only very weak absorbance at 200 nm owing to the presence of carbonyl groups (Blake 2007). This vitamin was detected in UV spectrum at 200 nm changing the wavelength detection at 7.5 min.

As a summary of this study, it can be said that a mobile phase containing H_2SO_4 at pH=3.5, with or without methanol, allows the separation in isocratic mode of six vitamins: ascorbic acid (C), thiamine (B_1), nicotinamide (B_3N), nicotinic acid (B_3H), pantothenic acid (B_5) and pyridoxine (B_6). However, vitamin B_2 , which is very important in honey analysis, cannot be eluted in an appropriate time with this mobile phase. Therefore, in the next step in this study, it was proceeded to introduce a surfactant in the mobile phase, with the aim to attempt the separation of the originally proposed eight vitamins including vitamin B_2 .

Study of Vitamin's Separation using a Surfactant in the Mobile Phase

As it is well known, in presence of a surfactant, in the mobile phase the molecules are located between the stationary phase, the formed micelles and the bulk mobile phase. This fact modifies their retention in the chromatographic system and yields unique selectivity for many compounds (Armstrong and Nome 1981; Ruiz-Ángel et al. 2009a, b). The presence of a surfactant in the mobile phase was used to separate vitamin B₂ from the other vitamins in an appropriate analysis time.

In a previous study realised by our research group, the separation of six water-soluble vitamins (B₁, B₂, B₃H, B₃N, B₆ and B₉) using an elution gradient was achieved in the presence of an anionic surfactant, sodium dodecylsulfate, SDS, and *n*-propanol in 11 min (Almagro et al. 2002). This surfactant offers a good separation in gradient elution, but it is not possible in isocratic mode. For this reason, and looking for a different surfactant that allows the separation in isocratic mode, it was tried on with a non-ionic [polyoxyethylene(23)lauryl ether, Brij 35] and another cationic (hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB) surfactants in concentrations above their critical micellar concentration which are 9×10^{-5} M for Brij 35 and 9×10^{-4} M for CTAB (Mittal and Lindman 1984).

The non-ionic surfactant was added to the mobile phase in a concentration 5 mM, and it does not offer good separation possibilities since all peaks of the vitamins appear at retention times close to the column dead time. The use of this surfactant was also tested in presence of MeOH 2 %, and the separation of the vitamins was not possible.

The cationic surfactant CTAB was added to the mobile phase in concentrations that ranged between 10^{-4} and 0.02 M, but for concentrations lower than 5×10^{-3} M the chromatogram baseline is not stabilised until at least 2 h, and the repeatability between chromatographic injections is bad. From the separations obtained with the different surfactant concentrations, it is found that 0.01 M is the minimum surfactant concentration that achieves the stabilisation of the column in a reasonable time, and it also could separate an acceptable number of water-soluble vitamins. Therefore, 0.01 M was the chosen surfactant concentration to separate the vitamins. However, the obtained peaks are wide and they have low efficiencies. To solve it, an organic solvent is also added to micellar mobile phases to improve peak efficiencies and to reduce retention times, giving rise to the so-called hybrid micellar mobile phases. In this study, the same alcohol in low quantity (methanol 2 %v/v) and the same than in absence of surfactant was chosen to improve peak efficiency and the separation. Thus, the first mobile phase tested was H₂SO₄ 0.01 %/CTAB 0.01 M/MeOH 2 %, pH=3.5. Using this mobile phase and in these conditions, riboflavin (vitamin B₂) can be eluted in isocratic mode in 6 min, shorter time than the ones found in the literature both in isocratic (Viñas et al.

2004a; Ekinci and Kadakal 2005) and gradient mode (Moreno and Salvadó 2000; Vidović et al. 2008; Ciulu et al. 2011). However, vitamin B₃H elutes in a long time and the peaks of the vitamins B₁ and B₆ overlap at dead time. Therefore, a study of vitamin retention as a function of pH was performed again, this time in presence of CTAB.

The pH does not affect the retention of vitamins B₂, B₃N, B₁ and B₆, but for pH values higher than 3 the retention of vitamins C and B₃H is dramatically altered. According to these results, it is essential to modify the pH of the mobile phase in presence of CTAB respecting to the same in its absence so that the mobile phase chosen in presence of the surfactant was H₂SO₄ 0.01 %/CTAB 0.01 M/MeOH 2 % at 25 °C and pH 2.75. Using this mobile phase, the separation of six vitamins (C, B₁, B₂, B₃N, B₃H and B₆) was achieved in isocratic mode, by UV at 254 nm and fluorescence detection at excitation/emission wavelengths 290/396 nm for B₆ and 450/520 nm for B₂, as it is shown in Fig. 2 with UV (a) and fluorescence detection (b). Folic acid (vitamin B₉), very unstable in acid medium, was not detected.

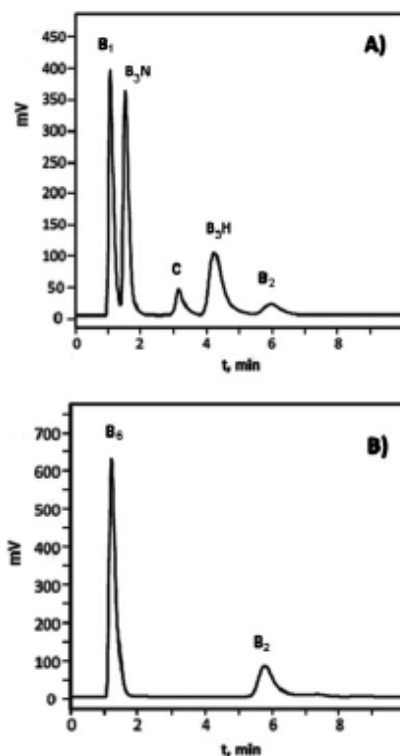


Fig. 2 Chromatographic separation of vitamins in a mobile phase H₂SO₄ 0.01 %/CTAB 0.01 M/MeOH 2 %, pH=2.75, 25 °C. a UV detection and b fluorescence detection

Table 1 Analytical characteristics for chromatographic method

Vitamin	t_R min	r	Sensitivity (L/mg)	Robustness ($n=4$), %RSD	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Repeatability $n=5$, % RSD (t_R /peak area)	Reproducibility $n=4$, % RSD (t_R /peak area)
H₂SO₄ 0.01 %/MeOH 2 % at pH=3.50 and 25 °C								
B ₁	2.77	0.9999	28,836	4.6	0.055	0.182	0.20/1.2	0.8/8.4
B ₃ H	3.58	0.9999	53,367	2.0	0.048	0.160	0.4/4.3	2.3/5.7
B ₃ N	7.32	0.9999	29,263	6.1	0.067	0.222	0.2/1.7	2.4/2.6
B ₅	9.79	0.9999	41,344	7.3	0.037	0.124	0.1/5.2	0.8/9.1
B ₆ ^a	4.39	0.9998	854,273	7.1	0.063	0.209	0.2/1.7	1.7/8.4
H₂SO₄ 0.01 %/CTAB 0.01 M/MeOH 2 % at pH=2.75 and 25 °C								
B ₂	5.67	0.9986	51,169	3.5	0.43	1.42	0.10/0.88	1.51/8.48
B ₃ H	4.59	0.9985	33,136	3.9	0.38	1.27	1.97/1.53	3.72/2.99
B ₃ N	1.43	0.9997	34,560	1.3	0.63	2.11	1.21/1.34	1.05/4.70
C	2.97	0.9981	37,832	2.6	0.64	2.13	0.19/0.35	4.16/3.76
B ₂ ^a	5.86	0.9983	411,030	8.0	0.15	0.49	0.45/1.49	1.49/8.84

^a Fluorescence detection

Analytical Features with H₂SO₄ 0.01 %/MeOH 2 % as Mobile Phase

The analytical features of the chromatographic method were determined using the mobile phase in absence of CTAB for the determination of vitamins B₁, B₃H, B₃N, B₅ and B₆. As discussed above, vitamins B₂ and B₉ cannot be eluted in a time shorter than 30 min, and for this reason they are not included in this section. Vitamin B₆ was determined using fluorescence detection which provides high sensitivity. In Table 1, the values are gathered for retention time, sensitivity, robustness, limit of detection, limit of quantification, and repeatability and reproducibility of retention time and peak area. The values found have a good sensitivity for all vitamins, and as can be expected, it is significantly higher for vitamin B₆ with fluorescence detection. The limits of detection are below 0.1 mg/L and the limits of quantification are lower than 0.3 mg/L; thus, they are very

adequate for this analysis in these samples. These detection limits are similar to those found in the literature in isocratic separations and in some cases lower than them, although the experimental conditions are different (Ekinici and Kadakal 2005; Burini 2007). Only in two determinations of one vitamin in its different vitamers was found lower detection limits for vitamins B₂ (Viñas et al. 2004b) and B₆ (Viñas et al. 2004a). The precision parameters can be considered acceptable. Consequently, the use of this mobile phase allows the quantification of vitamins B₁, B₃H, B₃N, B₅ and B₆ in an analysis time of 10 min. However, the analysis of vitamin B₂ is not possible.

Analytical Features with H₂SO₄ 0.01 %/CTAB 0.01 M/MeOH 2 % as Mobile Phase

The analysis of vitamin B₂ is only possible in the presence of a cationic surfactant. Thus, the mobile phase H₂SO₄ 0.01 %/CTAB 0.01 M/MeOH 2 % at 25 °C and pH 2.75

Table 2 Amount of water-soluble vitamins found in different types of honeys ($n=4$)

Mobile phase	H ₂ SO ₄ 0.01 %/MeOH 2 %/pH=3.50					H ₂ SO ₄ 0.01 %/CTAB 0.01 M/MeOH 2 %/pH=2.75	
	B ₁ (mg/100 g)	B ₃ N (mg/100 g)	B ₃ H (mg/100 g)	B ₅ (mg/100 g)	B ₆ (mg/100 g)	C (mg/100 g)	B ₂ (μg/100 g)
Rosemary	<0.005	<0.22	<0.05	<0.04	<0.06	1.90±0.01	<0.43
Thyme (1)	3.2±0.2	<0.06	0.192±0.001	0.27±0.06	0.022±0.002	1.49±0.10	<0.43
Thyme (2)	2.3±0.2	<0.06	<0.05	0.23±0.05	0.022±0.001	1.09±0.10	<0.43
Echium	0.26±0.02	0.02±0.01	0.05±0.01	<0.04	0.044±0.004	2.2±0.1	<0.43
Lavender	0.03±0.01	<0.06	0.31±0.02	<0.04	<0.06	0.98±0.04	<0.43
Honeydew	0.4±0.1	0.013±0.003	0.11±0.04	<0.04	<0.21	1.93±0.06	16.52±0.06
Chestnut	0.97±0.02	0.07±0.01	0.04±0.03	<0.04	<0.06	3.4±0.2	<1.42

was used to determine the analytical characteristics of vitamins C, B₃H, B₃N and B₂. Vitamins B₁ and B₆ were not determined with this mobile phase because their retention time is close to the column dead time; they are determined with the mobile phase in absence of CTAB. The retention time, sensitivity, robustness, limit of detection, limit of quantification, and repeatability and reproducibility of retention time and peak area are gathered in Table 1. In the case of vitamin B₂, these were also determined using fluorescence detection.

The sensitivity of this method is good for all vitamins, although in the case of vitamin B₃H this is lower (and limit of quantification higher) than in the absence of surfactant. Thus, the quantification of vitamin B₃H in honey samples has been carried out in the absence of CTAB.

As it was expected for vitamin B₂, the sensitivity obtained with FL detection is significantly higher than with UV detection. Limits of detection are lower than 0.7 mg/L with UV detection and lower than 0.2 mg/L for vitamin B₂ with fluorescence detection. The robustness

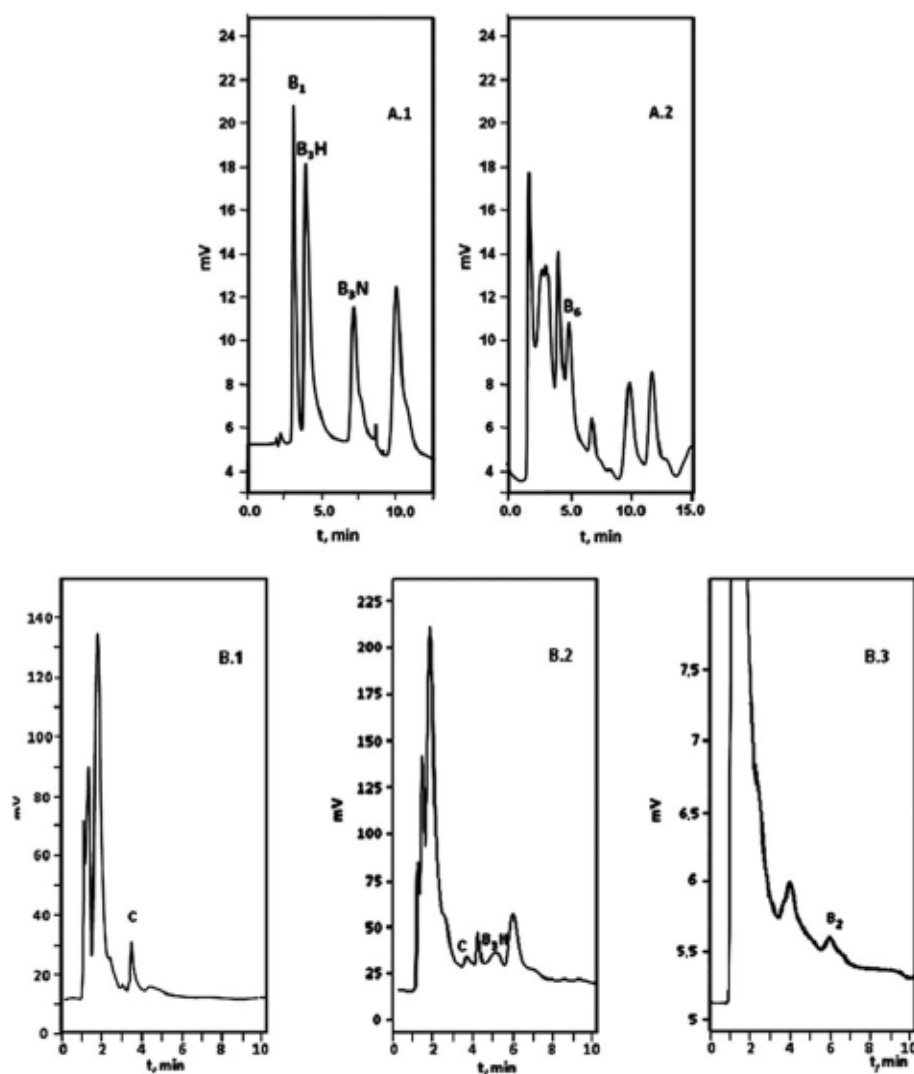


Fig. 3 Chromatograms of honey samples with a mobile phase H₂SO₄ 0.01 %/MeOH 2 %, pH=3.5, 25 °C (1 Echium UV, 2 Echium FL) and b mobile phase H₂SO₄ 0.01 %/CTAB 0.01 M/MeOH 2 %, pH=2.75, 25 °C (1 Echium UV, 2 Honeydew UV, 3 Honeydew FL)

gives RSD values between the slopes of calibration curves interdays lower than 5 % in all cases, by UV detection. The robustness obtained for vitamin B₂ by fluorescence is worse than by UV detection with a RSD value of 8 %.

The accuracy of the method was evaluated by adding different concentrations of the vitamins to honey samples, and the recoveries were calculated over the content determined in each sample when the sample contains the vitamin and directly if the sample does not contain it. The results are discussed in the next section.

Analysis of Water-Soluble Vitamins in Different Honey Samples

Both mobile phases chosen in the absence and in the presence of CTAB have been used to analyse real honey samples with different botanical origin. Table 2 summarises the results of the water-soluble vitamins concentrations found in all samples. As can be seen in this table, vitamin C is present in all samples, highlighting the thyme honeys whose amount is ten times higher than in the other honeys, something already found in an earlier work carried out by our group (León-Ruiz et al. 2011). Vitamin B₁ also appears in all honey samples with the exception of rosemary. In honey samples that belong to the Protected Denomination of Origin *La Alcarria Honey*, only vitamin C is detected in rosemary and B₁, B₃H and C in lavender.

Figure 3 shows the chromatograms corresponding to some of the samples analysed with both mobile phases as examples and using UV and fluorescence detection.

After the content of the different vitamins in honey samples was determined, 2.0, 4.0 and 6.2 mg/L of each vitamin were added to the samples. The results as the average of three determinations with their standard deviation are B₁ 102.6±18.4 %, B₂ 101.1±3.35 %, B₃H 109.4±5.7 %, B₃N 86.3±4.0 %, B₅ 90.1±3.1 % and B₆ 95.0±2.8 %. A *t* test was used to determine if there is a significant difference between the experimental average and the expected recovery (100 %), at 95 % confidence level. In all cases, *t*_{experimental} was less than the critical value; therefore, we conclude that there are not statistically significant differences between found recoveries and 100 %. According to AOAC acceptable recovery, as a function of the concentration (AOAC 2002), experimental recoveries were acceptable for the added concentrations.

In the case of vitamin C, the HPLC method was already tested in a previous research (León-Ruiz et al. 2011), compared with the titration with the 2,6-dichloroindophenol method (AOAC 2005), and no statistically significant differences were found.

Conclusions

A simple RP-HPLC method in isocratic mode has been developed to detect seven water-soluble vitamins (B₁, B₂, B₃H, B₃N, B₅, B₆ and C) in honeys. The combination of two mobile phases, H₂SO₄ 0.01 %/MeOH 2 %/25 °C/pH 3.50 and H₂SO₄ 0.01 %/CTAB 0.01 M/MeOH 2 %/25 °C/pH 2.75, provides a suitable method for the chromatographic separation, identification and quantification of these vitamins.

The analytical features using both mobile phases are good, with high sensitivity and low limits of detection. The presence of CTAB is especially useful for the determination of vitamins C and B₂.

The method has been applied successfully in the vitamin's determination in honeys with different botanical origins.

Additionally, for beekeepers it is very important to add the nutrition labelling as the amount of vitamins present in honey. According to the European Union (Commission Directive 2008; Council Directive 1990) on nutrition labelling for foodstuffs, 15 % of the recommended daily allowance (RDA) supplied by 100 g should be taken into consideration in deciding what constitutes a significant amount. In the case of studied honeys, all of them meet the requirement with respect to thiamin except lavender. In reference to vitamin C, only the thyme honeys follow the European Directive.

References

- Almagro I, San Andrés MP, Vera S (2002) *Chromatographia* 55:185
- Álvarez-Suárez JM, González-Paramá AM, Santos-Buelga C, Battino M (2010) *J Agric Food Chem* 58:9817
- Álvarez-Suárez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M (2010) *Mediterr J Nutr Metab* 3:15
- AOAC (2002) Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals, http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf
- AOAC (2005) Method 967.12. Official methods of analysis, 18th edn. AOAC, Gaithersburg
- Armstrong DW, Nome F (1981) *Anal Chem* 53:1662
- Blake CJ (2007) *Anal Bioanal Chem* 389:63
- Bogdanov S, Ruoff K, Persano Oddo L (2004) *Apidologie* 35:S4
- Burini G (2007) *J Chromatogr A* 1154:97
- Capella-Peiró ME, Carda-Broch S, Monferrer-Pons L, Esteve-Romero J (2004) *Anal Chim Acta* 517:81
- Casella IG, Gatta M (2001) *J Chromatogr A* 912:223
- Castro RN, Azeredo LC, Azeredo MA, Sampaio C (2001) *J Liq Chrom Rel Technol* 24:1015
- Ciula M, Solinas S, Floris I, Panzanelli A, Pilo MI, Piu PC, Spano N, Sanna G (2011) *Talanta* 83:924
- Commission Directive 2008/100/EC (2008) Amending Council Directive 90/496/EEC on nutrition labelling for foodstuffs as regards recommended daily allowances, energy conversion factors and definitions. *Off J Eur Union* L285:9
- Council Directive 90/496/EEC (1990) Nutrition labelling for foodstuffs. *Off J Eur Union* L276:40

- Council Directive 2001/110/EC (2001) Relating to honey. Off J Eur Union L10:47
- Council Directive 2006/1924/EC (2006) Nutrition and health claims made on foods. Off J Eur Union L404:9
- Council Directive 2008/108/EC (2008) Amending regulation (EC) No 1925/2006 on the addition of vitamins and minerals and of certain other substances to foods. Off J Eur Union L39:11
- Ekinci R, Kadakal C (2005) *Acta Chromatogr* 15:289
- Gheklouf N, Wang X, Engeseth NJ (2002) *J Agric Food Chem* 50:5870
- Hayakawa K, Katsumata N, Hirano M, Yoshikawa K, Ogata T, Tanaka T, Nagamine T (2008) *J Chromatogr B* 869:93
- Lachman J, Hejtmánková A, Sýkora J, Karhan J, Orsák M, Rygerová B (2010) *Czech J Food Sci* 28:412
- León-Ruiz V, Vera S, González-Porto AV, San Andrés MP (2011) *J Food Sci* 76:C356
- Miller JN, Miller JC (2005) *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Prentice Hall, Harlow
- Mittal KL, Lindman B (eds) (1984) *Surfactants in solutions*. Plenum, New York
- Monferrer-Pons L, Capella-Peiró ME, Gil-Agusti M, Esteve-Romero J (2003) *J Chromatogr A* 984:223
- Moreno P, Salvadó V (2000) *J Chromatogr A* 870:207
- Ruiz-Ángel MJ, Carda-Broch S, Torres-Lapasió JR, García Álvarez-Coque MC (2009a) *J Chromatogr A* 1216:1798
- Ruiz-Ángel MJ, García Álvarez-Coque MC, Berthod A (2009b) *Sep Purif Rev* 38:45
- Sato T, Miyata G (2000) *Nutrition* 16:468
- Vidović S, Stojanović B, Veljković J, Pražić-Arsić L, Roglić G, Manojlović D (2008) *J Chromatogr A* 1202:155
- Viñas P, Balsalobre N, López-Erooz C, Hernández-Córdoba M (2004a) *Chromatographia* 59:381
- Viñas P, Balsalobre N, López-Erooz C, Hernández-Córdoba M (2004b) *J Agric Food Chem* 52:1789
- White JW (1979) Composition of honey. In: Crane E (ed) *Honey: a comprehensive survey*. Heinemann, London, pp 157–206

CAPÍTULO V:

Propiedades funcionales de las mieles de Castilla-La Mancha: actividad antioxidante, antibacteriana y antihipertensiva

1. INTRODUCCIÓN

La miel ha sido un alimento natural muy importante para el hombre a lo largo de los tiempos, siendo el único concentrado de azúcares presente en casi cualquier parte del mundo [Krell, 1996]. Lo que marca la diferencia de este concentrado dulce con otros, es que además de azúcares contiene más sustancias, como minerales, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas hidrosolubles, polifenoles, enzimas, etc. Algunas de ellas son aprovechadas como nutrientes y otras, son sustancias que pueden ayudar a mejorar la salud, previniendo y/o regulando enfermedades de tipo cardiovascular, diabetes, cáncer, etc. Estos efectos hacen que se pueda englobar este producto entre los alimentos funcionales, que se definen como aquellos alimentos, elaborados o no, que por la presencia de compuestos biológicamente activos cumplen una función específica, como puede ser mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades.

Como ya se ha comentado a lo largo de esta tesis la composición química de la miel depende principalmente del origen botánico y en menor medida, de su origen geográfico, procesado y condiciones climatológicas. Así al depender la composición del

origen botánico, las propiedades nutricionales y medicinales van a ser diferentes en función del tipo de plantas que haya visitado la abeja, de ahí la importancia de estudiar sus propiedades por tipo de miel y no por miel en general.

Los estudios *in vivo* son fundamentales para legitimar las propiedades funcionales de alimentos, el problema es que involucran muchos recursos y tiempo, razón por la cual es muy recomendable contar con información preliminar, a base de experiencias *in vitro*, que los justifique y ayude a diseñarlos. Esto es lo que se ha llevado a cabo en este capítulo, estudiar *in vitro* si las mieles castellano-manchegas pueden considerarse alimentos funcionales, para tras su confirmación e interés, continuar en un futuro con estudios *in vivo* que definitivamente avalen estos resultados.

1.1 Actividad antioxidante de la miel

Los antioxidantes son sustancias nutritivas (o no), que retardan o inactivan las reacciones químicas destructivas en organismos vivos y alimentos. Estos compuestos funcionan en los organismos biológicos como protectores frente a enfermedades gracias a su habilidad para desactivar oxidantes y radicales libres, absorbiendo el daño molecular a nivel de los lípidos de las membranas celulares, proteínas y ácidos nucleicos [Schramm et al., 2003]. La mayor parte de estas moléculas dañinas son especies reactivas del oxígeno, muchas de ellas generadas por el propio metabolismo celular, tales como el anión superóxido, el radical hidroxilo o el radical peróxilo que pueden acarrear daños biológicos incluida la carcinogénesis, mutagénesis, envejecimiento y arterosclerosis. En la figura V.1 se esquematiza cómo se forman las especies reactivas (reacción en cadena), cuales son y cómo afectan al organismo.

Los compuestos antioxidantes actúan por desactivación de las especies radicales al tener la facilidad de ceder de forma, casi espontánea, un electrón. De esta forma, cuando se encuentran con un radical libre, el radical libre se estabiliza y se detiene la reacción en cadena, dejando de generar radicales libres. Por otro lado, el antioxidante se oxida y se convierte en una sustancia inocua.

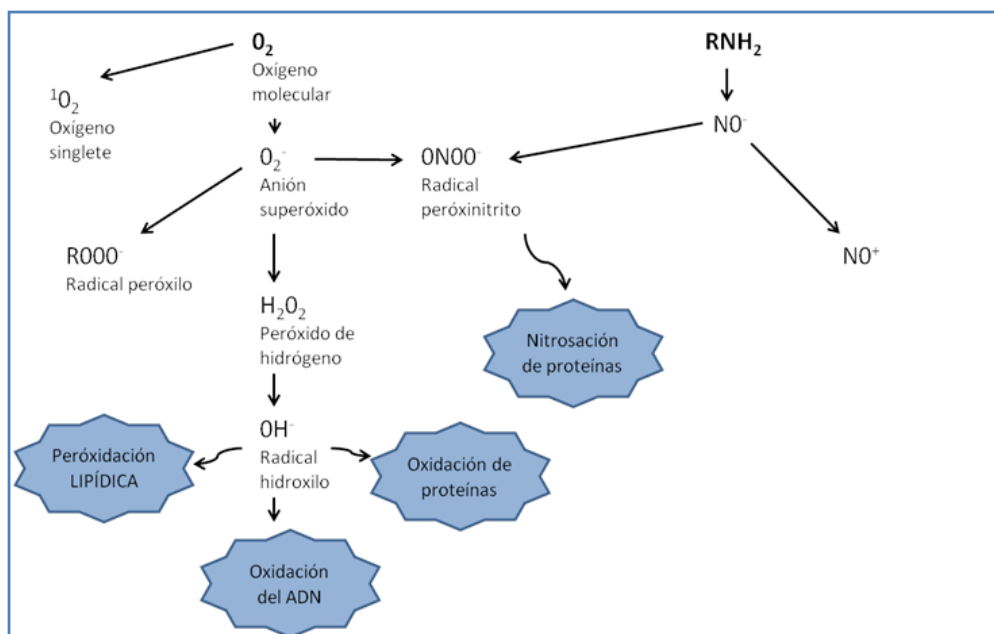


Figura V.1. Formación de especies reactivas del oxígeno en el metabolismo celular.

Que la miel posee un gran potencial como antioxidante natural, ha sido demostrado en numerosas ocasiones [Chen et al., 2000; Gheldof et al., 2002; Schramm et al., 2003; Ávila et al., 2006; Pérez et al., 2007; Vela et al., 2007; Estevinho et al., 2008; Álvarez-Suárez et al., 2010b; Brudzynski & Miotto, 2011]. Este potencial es debido a sus elevados niveles de componentes anti-radicales, que en algunos tipos de mieles son incluso similares a los encontrados en frutas y hortalizas [Gheldof & Engeseth, 2002]. Las principales sustancias antioxidantes encontradas en miel son: flavonoides (flavonoles, flavonas y flavonones), ácidos fenólicos (ácido benzoico y ácido cinámico) y otros ácidos orgánicos (ácido oxálico, glucónico, málico y cítrico), algunas enzimas (glucosa oxidasa, catalasa, etc.), productos de la reacción de Maillard, ácido ascórbico, péptidos y proteínas. En el caso de los flavonoides, se ha demostrado que exhiben un amplio rango de efectos biológicos, entre los que se incluyen: efectos antibacterianos, antiinflamatorios, antialérgicos, antitrombóticos y vasodilatadores [Al-Mamary et al., 2002; Khalil & Sulaiman, 2010]. Pero de forma general, la actividad antioxidante de la miel parece ser el resultado de la combinación sinérgica del amplio espectro de compuestos que poseen dicha capacidad [Gheldof et al., 2002; Khalil et al, 2012; Perna et al, 2013].

Como ya se ha mencionado, la composición de la miel es muy dependiente de su fuente floral, por lo que la cantidad y tipo de sustancias antioxidantes y, como consecuencia la potencia de dicha actividad, también varía mucho en función del origen botánico [Gheldof et al., 2002; Al-Mamary et al., 2002; Khalil et al, 2012; Perna et al, 2013]. Habitualmente se han encontrado concentraciones mayores de antioxidantes en las mieles más oscuras y turbias (como son las mieles de mielato, las de castaño, brezo, etc.) frente a las de un color más claro y transparentes (mieles de romero, espliego, azahar, acacia, etc.). Este hecho ha sido corroborado estadísticamente por varios autores, que han encontrado correlaciones positivas del color con alguna de las varias formas que hay de medir la actividad antioxidante [Chen et al., 2000; Taormina et al., 2001; Kesić et al., 2009; Álvarez-Suárez et al., 2010a; Cimpoiu et al., 2013].

Para estudiar si esta propiedad es asimilable y útil para la nutrición humana o animal hay que investigar en organismos vivos si dichos componentes pueden ser aprovechados por el organismo y de qué manera influyen en la salud humana. Esto ha sido corroborado en un estudio *in vivo* sobre la bio-disponibilidad de los antioxidantes en el organismo. Se observa un incremento de la actividad antioxidante en plasma al ingerir miel, con el correspondiente beneficio para la salud al inactivar estos compuestos especies reactivas de oxígeno presentes en la sangre y evitando así que lleguen a las células donde provocan los efectos perjudiciales. En este sentido los autores invitan a la sustitución de los edulcorantes tradicionales por miel [Schramm et al., 2003].

La mayoría de estudios sobre esta propiedad funcional han sido realizados *in vitro*, cuantificando los componentes con potencial antioxidante. Existen diversos métodos para evaluar dicha propiedad. Una de las estrategias más utilizadas para evaluar la actividad antioxidante total de un producto o alimento, consiste en determinar esta actividad frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional a la concentración. Ejemplos de estos métodos son: el ABTS (llamado así por el reactivo 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), DMPD (diclorhidrato de N,N-dimetilfenilendiamina, FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Férrica), ORAC (capacidad de absorber radicales oxígeno) y TEAC (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-

tetremetilcroman-2-carboxílico (Trolox) - actividad antioxidante equivalente) [Moniruzzaman et al., 2012]. Los más aplicados son los de ABTS y DPPH, ya que ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (con dióxido de manganeso, persulfato potasio), enzimática (con peroxidasa, mioglobulina), o también electroquímica [Kuskoski et al., 2005]. Además, los componentes antioxidantes que se evalúan, de manera individual, en alimentos son: ácido ascórbico, diferentes enzimas como catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, polifenoles totales o flavonoides totales [Moniruzzaman et al., 2012].

En la tabla V.1 se detallan los resultados de polifenoles totales (PT) encontrados en la bibliografía de los mismos tipos de mieles que se estudian en esta tesis, a modo de comparación. Solo se reflejan los resultados de PT ya que, la comparación directa entre la actividad antioxidante en términos de DPPH es mucho más difícil. Esto es debido a que las condiciones de reacción empleadas son diferentes ya que la metodología no está estandarizada [Perna et al., 2013].

La gran cantidad de datos de actividad antioxidante *in vitro* de muchos tipos de mieles, de orígenes geográficos tan diversos, indica no sólo que posee dicha actividad, sino que la miel es una rica fuente de antioxidantes [Chen et al., 2000; Gheldof et al., 2002; Schramm et al., 2003; Ávila et al., 2006; Pérez et al., 2007; Vela et al., 2007; Estevinho et al., 2008; Álvarez-Suárez et al., 2010b; Brudzynski & Miotto, 2011; Erejuwa et al., 2012].

1.2 Actividad antimicrobiana de la miel

La miel ha sido utilizada como medicina desde tiempos inmemoriales. El avance de los antibióticos en la medicina occidental relegó las conocidas aplicaciones antimicrobianas de la miel a un segundo plano. Pero hace un par de décadas se ha redescubierto como tratamiento para úlceras infectadas, escaras, quemaduras, heridas y gastroenteritis bacterianas en niños, sobre todo en algunas resistencias a antibióticos [Molan, 1992].

Tabla V.1. Contenidos de polifenoles totales presentes en varios tipos de miel.

Tipo de miel	POLIFENOLES TOTALES mg GAE/100 g	Procedencia	Referencia
Castaño	21.1	-	Beretta et al., 2005
	19.5	Lazio-Italia	Pichichero et al., 2009
	257 - 279	Turquía	Sarikaya et al, 2009
	14.3	Sur de Italia	Perna et al., 2013
	131.8	Norte de España	Escuredo et al., 2013
	82.5	Vento-Italia	Giorgi et al., 2011
	19.99	Eslovenia	Bertoncelj et al., 2007
Tomillo	12.7	Islas Egadi-Italia	Pichichero et al., 2009
	72 - 80	Portugal	Alves et al., 2013
	38.0	-	Socha et al., 2009
Mielato	6.08	Polonia	Socha et al., 2011
	103.0	Madrid-España	Pérez et al., 2007
	113.05 - 114.75	Burkina Fasso	Meda et al., 2005
	55.9 (de pino)	Servia	Gorjanović et al., 2013
	23 – 125	Rumanía	Al et al., 2009
	27.6	Lazio-Italia	Pichichero et al., 2009
	140.6	Norte de España	Escuredo et al., 2013
	9.38 -16.71	República Checa	Lachman et al., 2010
	45.0	Eslovaquia	Zalibera et al., 2008
	23.29 (de coníferas)	Eslovenia	Bertoncelj et al., 2007
Lavanda	58.24 – 71.88	Polonia	Wilczyńska, 2010
	11.14	Sur de Arabia Saudí	Alzahrani et al., 2012
Viborera	28.9	Japón	Nagai et al., 2012

La miel inhibe el crecimiento de microorganismos y hongos. El efecto de la miel frente a bacterias Gram-positivas está bien documentado [Bogdanov et al., 2008; Álvarez-Suárez et al., 2010a]. El efecto bacteriostático y bactericida de la miel se ha demostrado para un gran número de bacterias, muchas de ellas patógenas [Lin et al., 2011, Voidarou, et al., 2011; Mohapatra et al., 2012]. También se ha observado que inhibe el crecimiento del virus como la *Rubella (in vitro)* [Zeina et al., 1996], algunas especies de parásitos de los géneros *Leishmania* [Zeina et al., 1997, Bahrami et al., 2011] y *Echinococcus* [Kilicoglu et al., 2006] y hongos, sobre todo del género *Candida* [Irish et al., 2006, Koc et al., 2008, Ahmad et al., 2012].

La actividad antibacteriana de la miel se ha atribuido tanto a sus características físicas: alta osmolaridad y acidez, como a sus componentes químicos: principalmente el peróxido de hidrógeno y otros compuestos no relacionados con este, que se denominan compuestos “no-peróxido”.

En cuanto a los componentes químicos, como se ha mencionado, el peróxido de hidrógeno que se forma por la oxidación de la glucosa a ácido glucónico, es el principal responsable de esta actividad. Esta reacción está catalizada por la enzima glucosa oxidasa que es producida por las glándulas hipofaríngeas de las abejas [Weston et al., 1999]. Dicha enzima permanece prácticamente inactiva hasta que se diluye la miel, ya que la alta concentración de azúcares limita su funcionalidad. Esto quiere decir que en condiciones normales la miel apenas contiene H_2O_2 pero al ponerla en contacto con un tejido, por poner un ejemplo, que tenga una herida, se produce un tránsito de fluidos debido a su alta osmolaridad, que hace que se empiece a generar el peróxido *in situ*, desencadenando así el efecto antiséptico de la miel en la herida [White et al., 1963, Weston, 2000].

Por otro lado, se ha demostrado que cuando se adiciona catalasa (enzima que destruye el H_2O_2) a la miel en disolución, la actividad bacteriana no se elimina completamente si no que sigue existiendo una actividad residual cuya intensidad va a depender del origen floral de la miel. Esta actividad se ha achacado a los denominados componentes no-peróxido de la miel. Estas sustancias se han asociado con compuestos antioxidantes y proteicos como son: flavonoides (flavones, flavonoles, flavononas y dehidroflavonoles) [Cushnie & Lamb, 2005], compuestos fenólicos (ácidos cinámicos y sus ésteres) [Aljadi & Yusoff, 2003] o la enzima lisozima [Snowdon & Cliver, 1996]. Algunos autores afirman que los componentes no-peróxido son resistentes a la luz y al calor y que mantienen su actividad por largos periodos de tiempo, a diferencia del H_2O_2 [Bogdanov, 1997].

El origen floral de la miel, como ocurre para otras propiedades funcionales, va a ser primordial en la intensidad de la actividad antibacteriana. La miel de Manuka, un árbol endémico de Nueva Zelanda, *Leptospermum scoparium*, es la miel que mejor se ha estudiado por sus potentes propiedades antimicrobianas, aprovechándose para incrementar enormemente su valor comercial. Se creó un índice para determinar el

potencial antimicrobiano de esta miel, de cara a su utilización con fines terapéuticos: el UMF que es el acrónimo de “Unique Manuka Factor” (Factor Único de Manuka). El UMF se determina al comparar la actividad antibacteriana de la miel con la actividad antibacteriana del fenol (antiséptico) mediante un análisis estándar de laboratorio. Por ejemplo, una clasificación UMF de 10 es equivalente a la potencia de una solución al 10% de fenol. Cuanto más alto sea el UMF, mayor es la actividad antibacteriana. Así, la miel de Manuka se clasifica y etiqueta según su potencial antibacteriano. En general se acepta que la miel con un UMF de 10 es apropiada para uso medicinal [UMF, <http://www.umf.org.nz/>; Wallace et al., 2009]. La razón de la potente actividad antibacteriana de la miel de Manuka radica en que esta miel contiene varios compuestos fenólicos, entre ellos el ácido siríngico y metil siríngato, este último con una poderosa actividad frente a *Staphylococcus aureus* [Russel et al., 1990]. Recientemente, también se ha identificado metilglioxal (MGO) como compuesto antibacteriano en miel de Manuka, aunque el mecanismo de actuación no está bien esclarecido hasta el momento. El MGO está presente en varios alimentos, pero la concentración encontrada en este tipo de miel es excepcionalmente alta. Varios estudios indican que algunas personas pueden experimentar incluso sensibilidad a la miel de Manuka con UMF alto (20-30). De esta forma, se ha visto que el nivel de UMF óptimo para uso terapéutico está entonces entre 10-18, concentraciones superiores pueden ser perjudiciales para la salud [Adam et al., 2008; Mavric et al., 2008].

1.3 Actividad antihipertensiva de la miel

Además de la actividad antioxidante y antibacteriana, la miel posee otras propiedades terapéuticas y medicinales tales como actividad antimutagénica, antiproliferativa, hepatoprotectiva, hipoglucémica y antiinflamatoria [Bogdanov et al., 2008; Álvarez-Suárez et al., 2010b]. Sin embargo, los estudios sobre la efectividad y eficacia del uso de la miel frente a la hipertensión son muy escasos, encontrándose muy pocas investigaciones en la bibliografía especializada [Maruyama et al., 2009; Erejuwa et al., 2012; Nagai et al., 2012].

En una de las investigaciones sobre este tema, se utilizó la miel de Tualang en ratas hipertensivas, observándose que disminuyen sus niveles de tensión arterial [Erejuwa et al., 2012]. Otro tipo de miel en la cual se ha investigado la actividad

antihipertensiva, es la miel de viborera con resultados muy destacables [Nagai et al., 2012]. En otro estudio, la actividad antihipertensiva fue evaluada para otro producto de la colmena, los propóleos, demostrándose que cuando las ratas son alimentadas con extracto etanólico de propóleo verde, decrece su presión sanguínea [Maruyama et al., 2009].

La hipertensión, aunque es una enfermedad en sí misma que provoca un porcentaje no desdeñable de muertes, actúa como un potente factor de riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, hasta el punto de que la Organización Mundial de la Salud, OMS, estima que más del 60% de las enfermedades cerebrovasculares y casi la mitad de la enfermedad isquémica cardíaca puede atribuirse a ella. Debido a que su mortalidad directa no es tan elevada, y a que está muy extendida, la hipertensión arterial es una enfermedad con la que una gran parte de la población convive sin darle la importancia que realmente tiene. La prevalencia de hipertensión arterial en España se estima en torno a un 35%, aunque llega al 40% en edades medias al 68% en mayores de 65 años, afectando a más de 10 millones de personas en España [AESAN, 2012].

La presión arterial está controlada por diferentes vías en el organismo, figura V.2, siendo una de las más importantes el sistema renina-angiotensina, junto con el sistema quinina-caliceína, ambos regulados por la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Su inhibición provoca un efecto hipotensor. Actualmente, la presión arterial se puede controlar con la administración de antagonistas de los canales T de calcio, antagonistas de los receptores de Angiotensina II, diuréticos e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), que son muy eficaces, pero como la mayoría de los fármacos tienen sus limitaciones debido a sus reacciones adversas, efectos secundarios o interacciones con otros medicamentos e incluso con alimentos [FitzGerald & Murray, 2006].

Como consecuencia de la no total inocuidad de los fármacos, la búsqueda de alimentos que puedan ayudar a inhibir la ECA es una manera más saludable de bajar la tensión arterial. Ya se han encontrado en alimentos, sustancias, que cumplen esta función como es el caso de péptidos derivados de leche [Ortiz-Chao et al., 2009; Gonzalez-Gonzalez et al., 2011] o polifenoles [Liu et al., 2003].

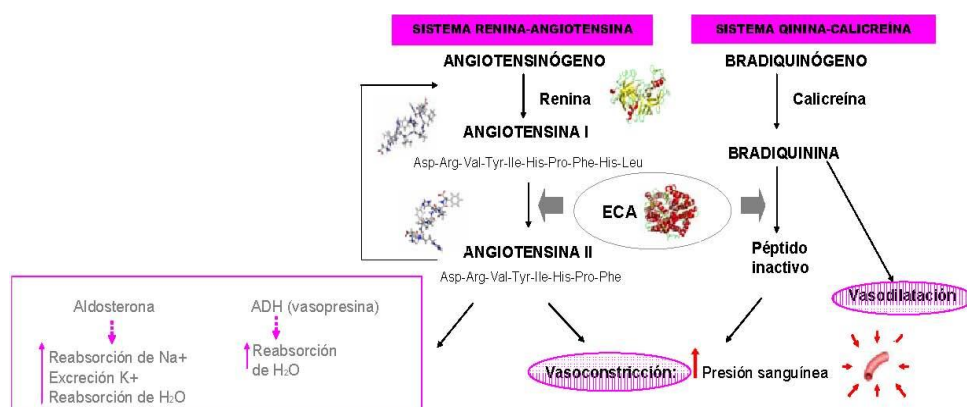


Figura V.2. Esquema de control de la presión arterial.

Estos últimos investigadores descubrieron que los taninos presentes en algunas hierbas estudiadas eran los responsables de la inhibición de la actividad ECA de forma no específica, sugiriendo una posible explicación a los conocidos efectos hipotensivos de esas hierbas tradicionales de China [Liu et al., 2003]. Como hemos visto anteriormente hay muy pocos estudios que avalen la utilidad de la miel en la disminución de la tensión arterial, pero los pocos estudios que existen han obtenido resultados muy positivos. Por estos motivos es importante ampliar la investigación sobre esta posible propiedad medicinal de este excepcional alimento.

2. OBJETIVOS

1. Estudiar la actividad antioxidante de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha. Analizar componentes antioxidantes como son los polifenoles y la vitamina C (analizada en el capítulo III de esta memoria). Estudiar la contribución de ambos componentes a la actividad antioxidante total.
2. Estudiar el potencial antibacteriano de estas mieles en varios tipos de bacterias, una Gram-negativa (*E. coli*) y otra Gram-positiva (*S. aureus*). Analizar la presencia de compuestos antibacterianos no-peróxido, como es el caso de la lisozima. Cuantificación de la actividad antibacteriana mediante la escala UMF para poder comparar con otros tipos de mieles.

3. Estudiar la disminución de la tensión arterial que produce la miel. Estudio de la inhibición de la enzima ECA, uno de los sistemas clave que regulan la tensión arterial que es la base de la eficacia de los principales fármacos antihipertensivos. El estudio se realiza con la miel en crudo, es decir sin separación de componentes, como la ingerimos de manera habitual.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras de miel

Para la determinación de la actividad antioxidante se han utilizado todas las muestras descritas en el capítulo II referente a la tipificación de estas mieles y se ha ampliado el número de muestras en mieles tomillo hasta 32, que era la que obtuvo unos resultados más destacables en vitamina C. En total el estudio de antioxidantes fue llevado a cabo con 80 mieles.

Para el estudio de la actividad antibacteriana y antihipertensiva, debido a la falta de tiempo, ya que el estudio fue realizado en una estancia de 3 meses en el *Department of Food & Nutritional Sciences* de la Universidad de Reading (Reino Unido), solo se han utilizado 20 mieles, 5 muestras por cada tipo de miel. Se escogieron únicamente los tipos de mieles más representativos y de mayor producción: romero, tomillo, espliego y castaño. Las muestras son identificadas del 1 al 5 como C para las mieles de castaño, R para romero, E para espliego y T para tomillo.

3.2. Análisis de componentes antioxidantes

El contenido en polifenoles totales ha sido determinado por el método Folin–Ciocalteu [Singleton et al., 1965]. El reactivo Folin–Ciocalteu fue suministrado por Fisher-Scientific (Loughborough, Reino Unido) y el ácido gálico, que fue utilizado como patrón de referencia, por Panreac (Barcelona, España). Para la obtención de la curva de calibración se ha utilizado un intervalo de concentraciones de ácido gálico de entre 0 y 5 mg/L. El contenido en polifenoles totales se expresa como mg de ácido gálico equivalente (GAE)/100 g de miel.

La determinación de vitamina C, de las 16 mieles de tomillo adicionales, ha sido realizada por HPLC con el método descrito en el capítulo III.

La actividad antioxidante ha sido medida por el método del radical DPPH según el procedimiento descrito por Vela et al. [2007]. El DPPH fue suministrado por Calbiochem (Darmstadt, Alemania). La actividad antioxidante se ha estimado usando una curva estándar de ácido ascórbico. Los resultados se han expresado como porcentaje equivalente de ácido ascórbico en términos de agotamiento de DPPH (%AAE).

3.3. Actividad antibacteriana

3.3.1. Determinación cualitativa de la actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana ha sido evaluada por la técnica de difusión en agar. Se ha estudiado la actividad frente a dos tipos de cepas bacterianas: una Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y otra Gram-negativa, *Escherichia coli* ATCC 25922.

El procedimiento seguido ha sido el desarrollado por Allen et al. [1991]: a un tubo con agar LB esterilizado (LB Agar Base, Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido) aproximadamente a 50°C se le adicionan 20 µL del inóculo, se extiende en placas de Petri y se incuba a 37°C durante unas 18 horas. Una vez que el agar se solidifica se realizan los pocillos con una herramienta esterilizada en forma de tubo de 6 mm de diámetro. En cada pocillo se adicionan 100 µL de la disolución de miel y se incuban las placas durante aproximadamente 18 horas a 37°C. Una vez incubadas las placas se mide el diámetro de las zonas de inhibición. Cada medida ha sido realizada en dos días diferentes y por duplicado cada día.

Previamente a lo anterior, los cultivos bacterianos se activan tomando una pequeña cantidad congelada de la bacteria con un asa de siembra desechable y estéril, y sembrada en placas de agar con medio LB e incubada a 37°C durante 24 horas. Los cultivos de trabajo o inóculos se obtienen colocando una colonia del cultivo anterior en 10 mL de medio LB con incubación de aproximadamente 18 horas a 37°C. El cultivo

de trabajo se diluye hasta una densidad final de $6-8 \cdot 10^8$ cfu/mL, que ha sido controlada aplicando la técnica de diluciones seriadas.

Cada muestra de miel se ha preparado al 50% (p/p) en frascos de color topacio, teniendo cuidado de evitar la luz y el calor, para minimizar en la medida de lo posible, la degradación de la enzima glucosa oxidasa y la pérdida de H_2O_2 . Una vez disuelta ha sido filtrada a través de un filtro de jeringa de $0.22 \mu m$ junto a un mechero Bunsen para tener mayor asepsia ambiental. A partir de esta disolución se han preparado el resto de diluciones.

3.3.2. Determinación de la actividad antibacteriana en presencia de catalasa

Una disolución de 2 mg/mL de catalasa se ha preparado fresca cada día, a partir de la enzima proveniente de hígado de vaca C-3515 5270 unidades/mg de proteína (Sigma Aldrich, Dorset, Reino Unido) en agua.

Se han preparado 2 disoluciones para cada miel de castaño, una en agua y otra en catalasa (2 mg/mL) a una concentración de 50% (p/p).

Se ha tomado una alícuota de 100 μL de estas disoluciones y se ha depositado en su correspondiente pocillo de la placa de agar infectada con la bacteria. Se ha incubado aproximadamente 18 horas a $37^\circ C$. Tras este periodo de incubación se ha medido el halo de inhibición formado alrededor de cada pocillo. Cada medida ha sido realizada en dos días diferentes y por duplicado cada día.

3.3.3. Determinación cuantitativa de la actividad antibacteriana

Para medir cuantitativamente la actividad antibacteriana y poder comparar con resultados publicados por otros autores, se ha llevado a cabo una calibración con un antibacteriano por excelencia, el fenol. El intervalo de concentraciones utilizado para la calibración fue de 2 a 7 % (p/v). El fenol (Fisons, Loughborough, Reino Unido) ha sido previamente disuelto hasta un 10% (p/v) en dimetilsulfóxido (Fisher-Scientific, Loughborough, Reino Unido): agua al 20% (v/v). A partir de esta disolución previa se ha preparado el resto de diluciones en agua. 100 μL de cada disolución estándar han sido depositadas en cada pocillo. Cada disolución se ha ensayado por duplicado.

En la curva de calibración se ha representado el cuadrado de la media del diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento frente a concentración de fenol. La medida de la actividad de cada miel diluida ha sido multiplicada por un factor de 2.35, que se obtiene al tener en cuenta la densidad de la miel (1.35 g/mL) y la dilución a la que se lleva a cabo el ensayo (50% (p/p)). La actividad antibacteriana se expresa como Concentración Equivalente de Fenol (% (p/v)) o UMF de la miel sin diluir.

3.3.4. Determinación de lisozima

El análisis de la enzima lisozima ha sido llevado a cabo en un equipo de HPLC-DAD (Dionex Softron GmbH, München, Alemania) con una bomba P680, un inyector automático ASI-100 T, un horno para la columna TCC-100, un detector de fotodiodos PDA-100 y un software Chromaleon Datasystem v 6.50 SP4 Build 1000. La columna cromatográfica utilizada ha sido una Ace5 C18, 250 x 4.6 mm, 5µm (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Escocia).

La lisozima se ha determinado empleando un método cromatográfico en modo gradiente de elución. La fase móvil A es agua con 0.1% de ácido trifluoroacético y la fase B, acetonitrilo con 0.08% TFA. El gradiente de elución utilizado es de 0% a 45% de B en 60 minutos, hasta 70% de B en 65 minutos finalizando con 0% de B en 75 minutos con un flujo de 0.8 mL/min. El volumen de inyección es de 50 µL. Los cromatogramas han sido registrados a una longitud de onda de 214 nm y la temperatura de trabajo de $40 \pm 1^\circ\text{C}$.

La disolución estándar de la enzima (Lisozima de clara de huevo de pollo, Sigma Aldrich, Dorset, Reino Unido) ha sido preparada en 0.01 M K_2HPO_4 y a partir de esta se preparaban las diluciones de calibración (entre 10 y 200 mg/L) en agua. El límite de detección del método ha sido establecido como la concentración que corresponde a 3 veces el área del mínimo pico detectable sobre el ruido de fondo cuando se va bajando progresivamente la concentración de lisozima, mientras que el límite de cuantificación se ha calculado de la misma forma tomando 10 veces el área.

En principio, en este estudio se analizaron 3 muestras de cada tipo de miel estudiado (romero, espliego, tomillo y castaño). Como se encontró una cantidad mayor de lisozima en las mieles de castaño, se analizaron posteriormente otras 2

muestras de esta miel, en total 5 muestras de castaño. Las muestras de miel se han preparado por pesada de 0.5 g disuelta en 10 mL de agua ultrapura. Esta disolución ha sido filtrada con un filtro de jeringa de 0.45 μm antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

3.4. Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA *in vitro*.

La actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (%IECA) se ha determinado siguiendo el procedimiento descrito por González-González et al. [2011]. Este método está basado en la hidrólisis del sustrato N-hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) a ácido hipúrico (AH) y His-Leu (HL) por la enzima ECA. El AH liberado ha sido medido en el mismo sistema de HPLC utilizado para el análisis de lisozima y con la misma columna. El IC_{50} se ha extraído de la ecuación lineal obtenida al representar la inversa de %IECA frente a la inversa de concentración de miel (de 1 a 50% (p/p)). El %IECA de cada muestra ha sido analizado por duplicado y cada replica se ha inyectado dos veces en el sistema cromatográfico. La enzima ECA (de tejido de pulmón de conejo) y el HHL fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Dorset, Reino Unido).

Para la determinación del %IECA se han diluido las mieles al 50% (p/p) en agua. Se han analizado las 20 muestras, 5 mieles diferentes de cada tipo floral (espliego, romero, tomillo y castaño). Para el cálculo del IC_{50} se ha utilizado la miel que en el ensayo de la determinación del %IECA daba un valor más alto, es decir la miel de castaño C3.

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se ha llevado a cabo con el programa Statgraphics para Windows 5.1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Actividad antioxidante

Se han utilizado numerosos métodos para medir la actividad antioxidante de alimentos y muestras biológicas, pero no hay un método universal establecido

[Ferreira et al., 2009]. En este estudio, la actividad antioxidante ha sido evaluada mediante la determinación de diferentes parámetros todos ellos *in vitro*. En primer lugar, se ha empleado un método de análisis global de antioxidantes conocido como el método del radical DPPH y, por otra parte se han determinado algunos componentes que pueden contribuir a la actividad antioxidante, como son los polifenoles totales (PT). Además se ha incluido el ácido ascórbico (vitamina C), del que se han tomado las concentraciones determinadas previamente en el capítulo III y se han analizado 16 muestras de miel de tomillo adicionales, muestras T17-T32 de la tabla II.3. Los resultados obtenidos para todos los tipos de mieles analizados se presentan en las tablas V.2, V.3 y V.4.

Tabla V.2. Actividad antioxidante (%DPPH) de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desv. estándar.	Mínimo - Máximo
Romero	11	25.19	17.87	8.93 – 64.27
Espliego	9	12.13	6.90	3.51 – 25.60
Tomillo	32	87.64	14.77	40.74 – 97.64
Viborera	13	26.74	24.40	7.58 – 85.59
Castaño	11	54.85	15.84	30.63 – 77.53
Mielato	5	48.70	18.35	24.23 – 74.14

Tabla V.3. Contenido en polifenoles totales (mg GAE/100 g de miel) de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desviación estándar	Mínimo - Máximo
Romero	11	23.92	9.40	10.70 – 45.02
Espliego	9	55.30	5.94	47.06 – 66.40
Tomillo	32	122.13	36.08	50.46 – 220.30
Viborera	12	63.58	28.36	38.07 – 135.92
Castaño	11	127.08	31.45	74.85 – 165.35
Mielato	5	98.11	35.67	62.46 – 148.98

Tabla V.4. Contenido en **vitamina C** (mg /100 g de miel) de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

Tipo de miel	n	Valor medio	Desviación estándar	Mínimo - Máximo
Romero	11	7.00	8.84	0.61 – 30.90
Espliego	9	1.82	1.07	0.70 – 3.64
Tomillo	32	105.63	60.85	24.20 – 326.78
Viborera	12	3.21	2.87	0.77 – 11.71
Castaño	11	5.80	5.67	1.03 – 19.76
Mielato	5	6.46	9.89	0.76 – 23.95

La **vitamina C** presenta un valor muy elevado en las mieles de tomillo como se ha comentado en el capítulo III de esta memoria.

Los **polifenoles totales** (PT), que son metabolitos secundarios de plantas que la abeja transfiere a la miel, contribuyen más en la fluctuación de la actividad antioxidante entre los diferentes tipos de miel que la vitamina C. Los tipos de miel con mayor contenido de polifenoles son los de tonalidades oscuras [Chen et al., 2000; Taormina et al., 2001; Ávila et al., 2006; Ferreira et al., 2009; Kesić et al., 2009; Álvarez-Suárez et al., 2010a; Cimpoiu et al., 2012], lo que se cumple también en este trabajo, las mieles de mayor contenido antioxidante son las de castaño y mielato. Por el contrario, las mieles de viborera, espliego y romero, más claras (color ámbar claro), tienen los niveles más bajos de PT, siendo las de romero, de ámbar claro a blanco, las de menor contenido. A destacar las mieles de tomillo, de una tonalidad ámbar claro con tonos rojizos, que presentan valores muy elevados de PT, próximos a los obtenidos para las mieles más oscuras (castaño y mielato).

En la figura V.3 se representa cada componente antioxidante analizado en forma de barra, así como la actividad antioxidante total (DPPH) en forma de línea en cada tipo de miel. Se puede observar de esta forma la contribución de cada componente a la actividad antioxidante total.

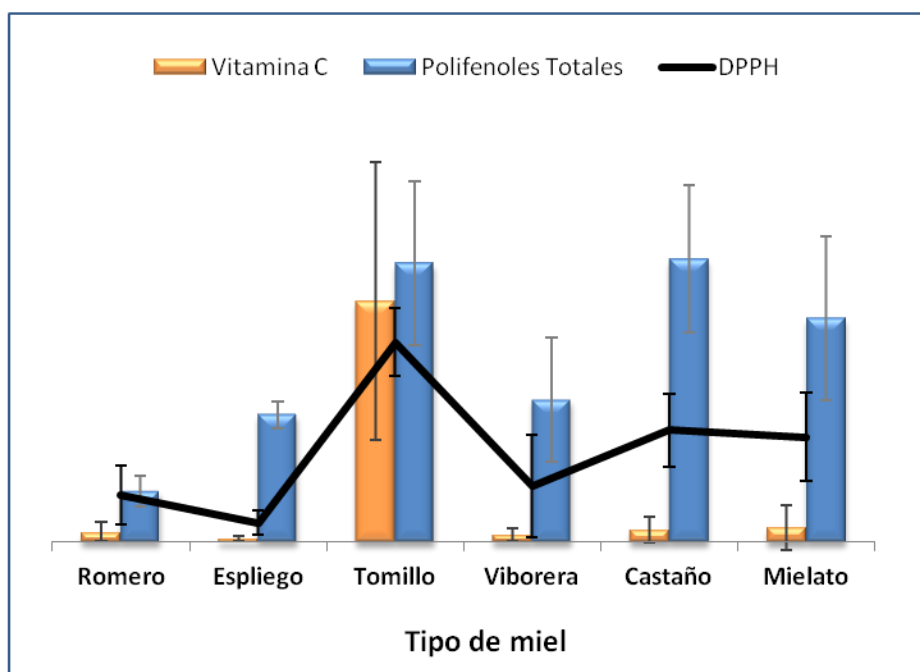


Figura V.3. Gráfico comparativo entre los componentes antioxidantes analizados: vitamina C (mg/100 g), polifenoles totales (mg GAE/100 g) y la actividad antioxidante total, %DPPH.

De acuerdo con los resultados mostrados en la figura V.3, la actividad antioxidante está relacionada, de forma simultánea, con el contenido de polifenoles totales y vitamina C.

4.1.1. *Correlación entre la actividad antioxidante y las concentraciones de polifenoles totales y vitamina C. Regresión múltiple*

Con el fin de establecer estadísticamente la relación de la actividad antioxidante y los componentes antioxidantes analizados, se ha llevado a cabo un análisis de regresión múltiple del %DPPH con respecto a las variables PT y vitamina C. En la Tabla V.5 se recogen los coeficientes correspondientes a cada una de las variables con sus intervalos de confianza al 95%, el p-valor para la influencia de cada una de las variables y de la varianza total, la ecuación teórica ajustada y el porcentaje de ajuste de los valores experimentales a dicha ecuación. En la figura V.4 se han representado los valores observados frente a los valores predichos por la ecuación teórica.

Tabla V.4. Parámetros estadísticos de la regresión múltiple de %DPPH frente a PT y vitamina C para un nivel de confianza del 95%

Parámetro	Coefficiente \pm intervalo confianza	P-valor	P-valor ANOVA
PT	0.4686 \pm 0.0590	0.0000	0.0000
Vitamina C	0.1987 \pm 0.0789	0.0000	
%DPPH = 0.4686 PT + 0.1987 Vitamina C			Ajuste ecuación 91.35

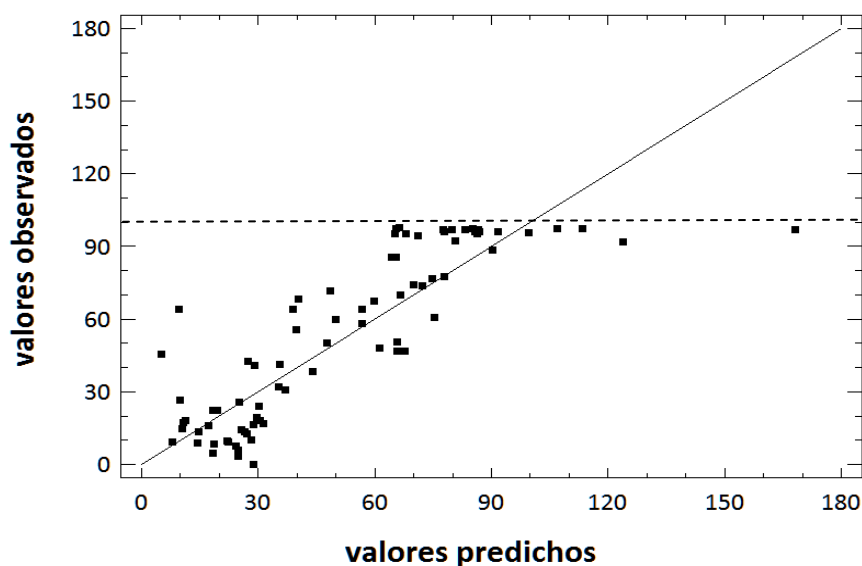


Figura V.4. Representación de los valores de %DPPH observados experimentalmente para frente a los predichos por el modelo teórico.

Como se observa en la tabla V.4, el p-valor para las dos variables, PT y vitamina C es 0.0000 y por tanto para cualquier nivel de significación ambas son estadísticamente significativas en la ecuación teórica. Además el p-valor para el análisis de varianza es también 0.0000 por lo que el modelo explica la variabilidad de los datos para cualquier nivel de significación. El valor de r^2 (ajustado para los grados de libertad) es de 91.35% por lo que la variabilidad de los datos se explica con un porcentaje de ajuste elevado. Por tanto, la actividad antioxidante medida como %DPPH tiene una buena correlación con el contenido de especies antioxidantes en las

mieles como son los polifenoles totales y la concentración de vitamina C de forma simultánea.

Sin embargo, se observa que las muestras con alta actividad antioxidante, próxima al 100% se apartan del modelo teórico ya que el valor de %DPPH está limitado y no puede aumentar más (por encima de la línea discontinua en la figura V.4). Por ello, en esta figura no aparece aumento de la actividad antioxidante como %DPPH aunque según el modelo teórico debería ser mayor.

4.2. Discriminación de las mieles por su origen botánico, parte D. Análisis lineal discriminante, LDA

Con el fin de estudiar la posibilidad de clasificar las mieles de Castilla-La Mancha en función de los 3 parámetros anteriores (%DPPH, vitamina C y PT) en función de su origen botánico se ha realizado un análisis discriminante incluyendo todas las variables. Se encuentran 3 funciones discriminantes con *p*-valores inferiores a 0.05 (para 95% de confianza). Los autovalores, correlación canónica, estadístico Lambda de Wilks y porcentaje de varianza explicada por cada función discriminante se recogen en la tabla V.5.

Tabla V.5. Resumen del análisis discriminante

Función discriminante	Autovalor	Porcentaje de varianza	Correlación canónica	Lambda de Wilks	p-valor
1	2.8730	67.46	0.8613	0.1017	0.0000
2	1.2671	29.75	0.7476	0.3943	0.0000
3	0.1188	2.79	0.3258	0.8938	0.0288

Para valorar la significación estadística del conjunto de las tres funciones discriminantes obtenidas se estudian los diferentes estadísticos, Lambda de Wilks y su p-valor, los valores de la correlación canónica y los autovalores, y el porcentaje de la varianza total explicada. El p-valor es inferior a 0.05 para las tres funciones discriminantes aunque con las 2 primeras se explica un 97.21% de la varianza con correlaciones canónicas cercanas a la unidad por lo que se toman estas 2 primeras

funciones. Con estas 2 primeras funciones discriminantes se ha llevado a cabo la clasificación de los seis tipos de mieles analizadas. La tabla V.6 muestra el porcentaje de clasificación correcta obtenido para cada uno de ellos.

Tabla V.6. Clasificación de los seis tipos de miel, en porcentaje

TIPO	GRUPO DE PERTENENCIA PRONOSTICADO					
	CASTAÑO	ESPLIEGO	MIELATO	ROMERO	TOMILLO	VIBORERA
CASTAÑO n=13	69.23	0	7.69	0	0	23.08
ESPLIEGO n=10	0	80.00	0	0	10.00	10.00
MIELATO n=5	40.00	0	40.00	0	0	20.00
ROMERO n=11	0	9.09	0	90.91	0	0
TOMILLO n=32	0	0	9.38	3.13	87.50	0
VIVORERA n=15	6.67	60.00	13.33	6.67	0	13.33

CLASIFICACIÓN CORRECTA: 68.60%

Como se observa en la tabla V.6, el porcentaje global de clasificación correcta para todas las mieles según su origen botánico es del 68.60%. Las mieles de castaño, espliego, tomillo y romero, presentan una correcta clasificación con porcentajes entre el 69.23 y el 90.91%. Por el contrario mientras que las mieles de mielato y viborera son las peor clasificadas. La figura V.5 muestra el gráfico de representación de las dos funciones discriminantes.

Como conclusión se puede decir que los tres parámetros antioxidantes analizados (% DPPH, PT y vitamina C) permiten una buena clasificación de las mieles en función del origen botánico en el caso de las mieles producidas en la Alcarria y las mieles de castaño. Sin embargo, si se compara con el porcentaje de clasificación obtenido para estas mieles cuando se emplean otros parámetros físico-químicos determinados y discutidos en los capítulos anteriores de esta memoria (entre los que se incluye como variable la concentración de vitamina C), se encuentra que la discriminación con los parámetros antioxidantes no mejora la clasificación de las mieles por su origen botánico.

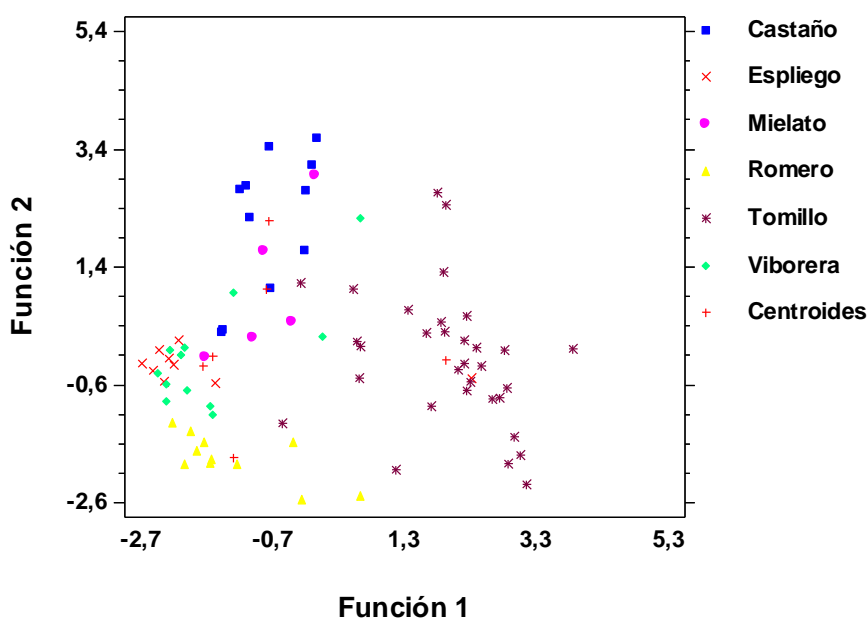


Figura V.5. Gráfico de las 2 funciones discriminantes obtenidas para los parámetros antioxidantes

4.3. Actividad antibacteriana

Entre las propiedades funcionales de la miel, se ha evaluado la actividad antibacteriana de 4 tipos de miel producidos en Castilla-La Mancha (romero, espliego, tomillo y castaño). El ensayo antibacteriano se ha hecho con la técnica de difusión en agar con dos bacterias diferentes, una Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) y una Gram-negativa (*Escherichia coli*) para ver la amplitud de acción de estas mieles. Se ha realizado un ensayo con catalasa (para eliminar el H_2O_2) con objeto de comprobar si sigue habiendo actividad antibacteriana debida a compuestos “no peróxido” en estas mieles. Se ha determinado la cantidad de lisozima en cada miel como posible componente “no peróxido”. Por último se ha cuantificado la actividad antimicrobiana en términos de Concentración Equivalente de Fenol (% p/v) que es la forma de comparar la potencia de actividad antibacteriana entre mieles. Este método se utiliza habitualmente para la especificación comercial de la miel de Manuka, que es una de las más potentes conocidas y es utilizada incluso a nivel hospitalario en tratamiento de heridas y otras afecciones de la piel.

4.3.1. Actividad antibacteriana frente a *E. coli*

Los resultados obtenidos de la inhibición del crecimiento de esta bacteria Gram-negativa por efecto de la miel diluida, se muestran en las fotografías de la figura V.6. y los diámetros de los halos de inhibición de representan en las figura V.7. y V.8 para los 4 tipos de miel estudiados.

Como se observa en la dilución de miel al 50% (p/p) (Figura V.6.1), se aprecian dos halos de inhibición de diferente claridad alrededor del pocillo correspondiente a la miel de castaño (A). Un halo más próximo al pocillo, totalmente transparente, que presenta nulo crecimiento de bacterias (zona de inhibición completa) y el halo más externo al pocillo, donde se aprecia una ligera turbidez que indica crecimiento bacteriano (zona de semi-inhibición). En el resto de tipos de miel solo aparece el halo de semi-inhibición.

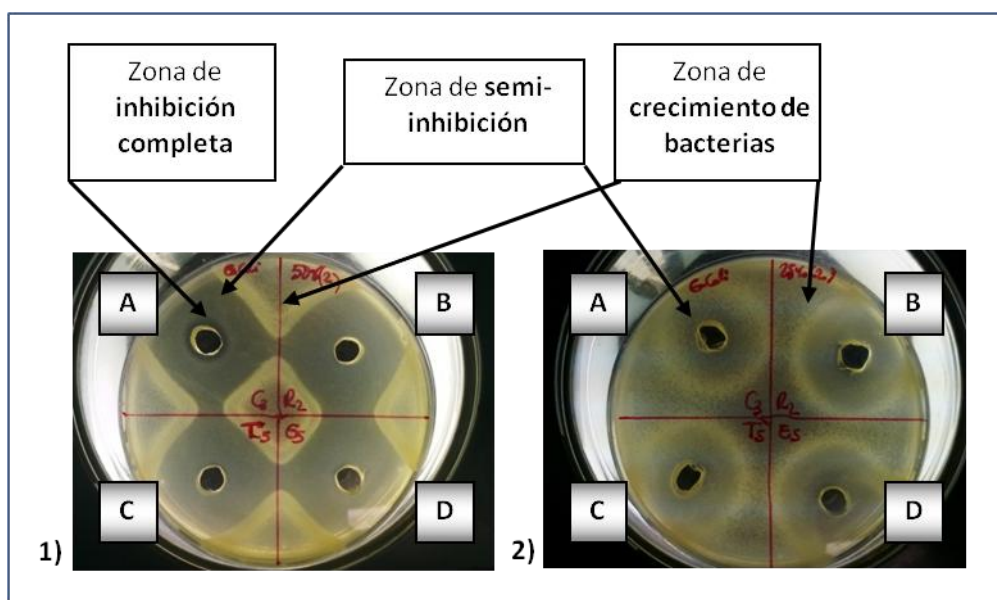


Figura V.6. Inhibición del crecimiento de *E. coli* producida por miel en disolución. 1) Dilución de miel al 50% (p/p). 2) Dilución de miel al 25% (p/p). A. Miel de castaño, B. Miel de romero, C. Miel de tomillo, D. Miel de espliego.

La existencia de dos halos de inhibición indica que hay dos tipos de factores bactericidas o bacteriostáticos con diferente potencial y que además, difunden de

distinta forma. El hecho de que la inhibición completa esté presente únicamente en la miel de castaño y no en el resto de mieles, indica que hay un factor que el resto de mieles no poseen o tienen en menor cantidad (no llegando a ser completamente eficaces contra esta bacteria).

En el ensayo con la dilución de miel al 25% (p/p) (figura V.6.2) solo se aprecia el halo de semi-inhibición, con un diámetro más pequeño que en la de la dilución al 50%.

Lo mismo ocurre al aumentar la dilución hasta el 10% (p/p), el diámetro del halo de semi-inhibición va disminuyendo progresivamente al aumentar la dilución de la miel (figura V.8).

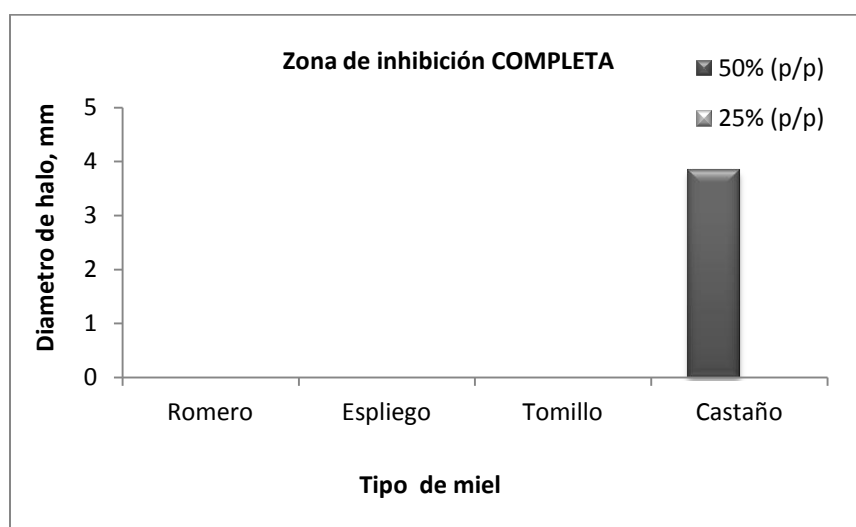


Figura V.7. Representación del halo de inhibición (completa) del crecimiento de *E.coli* de los distintos tipos de miel a diferentes concentraciones.

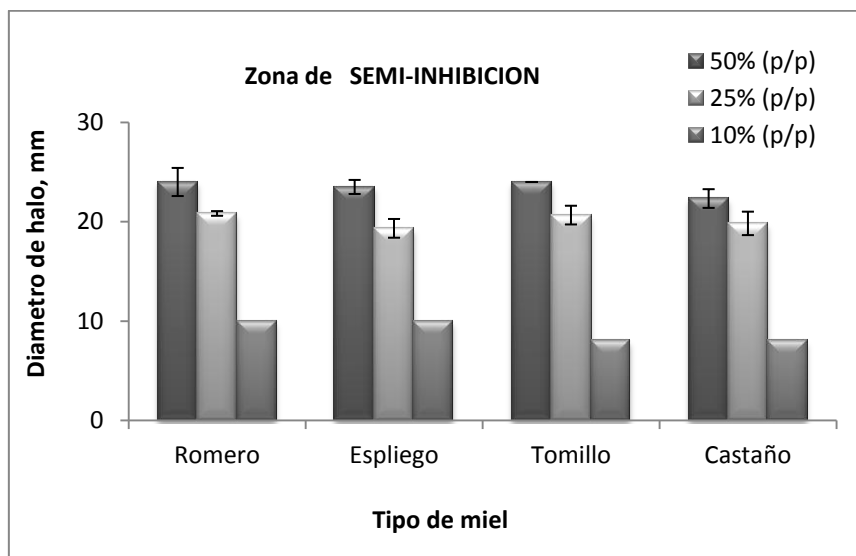


Figura V.8. Diámetro del halo de semi-inhibición del crecimiento de *E.coli* de los distintos tipos de miel a las diferentes concentraciones.

4.3.2. Actividad antibacteriana frente a *S. aureus*

A continuación se ha llevado a cabo el mismo experimento anterior pero con una bacteria Gram-positiva (*S. aureus*). En la figura V.9. se aprecia que únicamente la miel de castaño inhibe el crecimiento de *S. aureus*. El diámetro del halo de inhibición está representado en la figura V.10., donde se observa que el resto de tipos de miel no impiden el desarrollo de la bacteria. El efecto inhibitorio es mayor que para la anterior cepa (*E. coli*), a igual concentración de miel mayor diámetro de inhibición.

El hecho de que el halo producido por la miel de castaño en el crecimiento de *S.aureus* sea mayor que el de *E.coli* está en concordancia con lo publicado por Álvarez-Suárez et al. (2010a) en cuanto a que, en general, las bacterias Gram-positivas son más sensibles a la acción antimicrobiana de la miel que las Gram-negativas. Sin embargo con esta bacteria no aparece el halo de semi-inhibición que era causado, como se comentó anteriormente, por factores antibacterianos comunes a las mieles. Un importante factor común es la alta osmolaridad de la miel y, que estas bacterias no se vean afectadas por ello, se explica si tenemos en cuenta que *S. aureus* es osmotolerante [Allen et al., 1991].

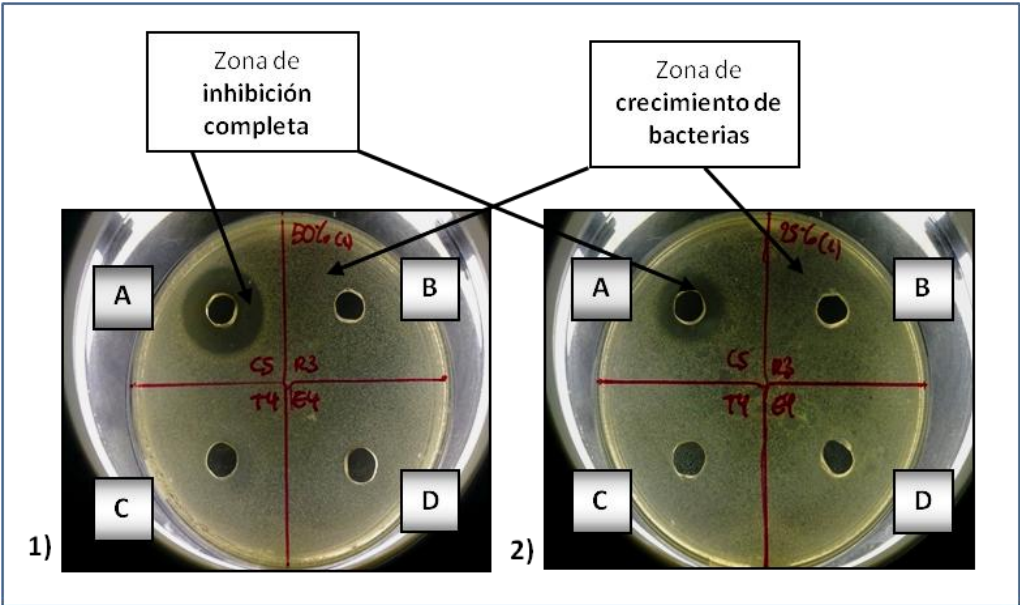


Figura V.9. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* producida por miel en disolución. 1) Dilución de miel al 50% (p/p). 2) Dilución de miel al 25% (p/p). A. Miel de castaño, B. Miel de romero, C. Miel de tomillo, D. Miel de espliego.

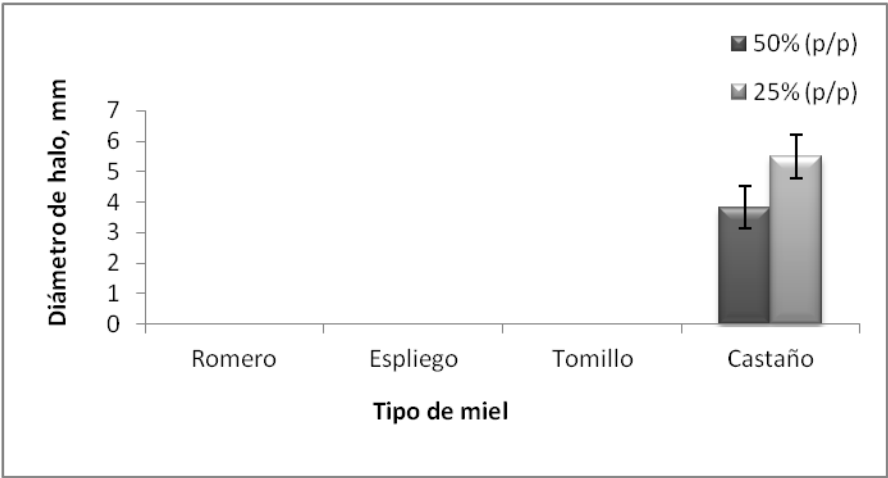


Figura V.10. Diámetro de la inhibición del crecimiento de *S. aureus* (halo de inhibición único) producida por los distintos tipos de miel a las 2 diferentes concentraciones.

4.3.3. Estudio de la actividad antibacteriana no-peróxido

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, los agentes antibacterianos de la miel pueden ser propiedades físicas y componentes químicos. Entre los componentes químicos están el peróxido de hidrógeno y los compuestos denominados “no peróxido”. Dentro de este último grupo se encuentran, entre otros, la lisozima. Para estudiar la actividad antibacteriana no-peróxido, se comprueba si queda actividad antibacteriana residual tras la adición de catalasa y se evalúa la presencia de lisozima en estas mieles.

A) Contenido de lisozima en las muestras de miel

La lisozima es una enzima que tiene actividad antibacteriana porque degrada los polisacáridos (ácido N-acetilmuránico) de las paredes celulares de muchas bacterias.

Hay pocos estudios publicados sobre lisozima en mieles [Mohrig & Messner, 1968; Bogdanov, 1984] y entre lo poco que hay, Bogdanov et al. [1984] ni siquiera consiguieron detectarla. Debido al discreto conocimiento de las cantidades presentes de esta enzima en la miel y por evaluar como contribuye a su efecto antibiótico, se ha estudiado el contenido de esta enzima en las mieles de Castilla-La Mancha.

Se ha analizado el contenido en lisozima, en 3 de las 5 muestras disponibles de cada tipo de miel a modo de prueba, ya que el tiempo disponible era escaso. Además en la mayor parte de los tipos de miel no se detectó suficiente actividad antibacteriana como para inhibir el crecimiento bacteriano, por lo tanto no tendría sentido buscar sustancias antimicrobianas en todas las muestras.

Los resultados más relevantes de este estudio son que, únicamente las mieles de castaño tienen concentraciones cuantificables de lisozima. En el resto de mieles, romero, espliego o tomillo, se encontraron concentraciones por debajo del límite de cuantificación o no se detectaron. Al obtener estos resultados en las mieles de castaño, se analizaron finalmente todas las muestras disponibles de este tipo de miel. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla V.7.

Tabla V.7. Contenido en lisozima (mg /100 g de miel) de las mieles monoflorales de Castilla-La Mancha.

Tipo de miel	Muestra	Lisozima (mg/100 g de miel) \pm s ^a	
		Por muestra	Por tipo de miel
Romero	R3	<1.47 ^b	
	R4	<1.47 ^b	<1.47
	R5	<1.47 ^b	
Espliego	E1	<4.90 ^c	
	E3	<4.90 ^c	<4.90
	E5	<4.90 ^c	
Tomillo	T1	<1.47 ^b	
	T4	<1.47 ^b	<2.61
	T5	<4.90 ^c	
Castaño	C1	17 \pm 2	
	C2	<4.90 ^c	
	C3	15 \pm 3	19 \pm 4
	C4	24.8 \pm 0.2	
	C5	21 \pm 2	

^a s = desviación estándar; ^b Menor del límite de detección; ^c Menor del límite de cuantificación

B) Estudio de la reducción de la actividad antibacteriana con catalasa

La actividad antibacteriana no peróxido se ha estudiado adicionando catalasa a la disolución de miel, con el objetivo de destruir el H₂O₂ y comprobar de esta forma, si persiste inhibición del crecimiento bacteriano, lo que implica que hay más componentes antibacterianos en la miel, los comúnmente denominados no-peróxido.

Para este estudio solo se han utilizado las mieles de castaño, que eran las únicas que tenían actividad antibacteriana completa. El estudio se ha hecho para ambas bacterias. En la tabla V.8 se resumen los resultados de la reducción de la actividad

antibiótica de la miel por la adición de catalasa en ambas cepas. Como puede observarse el efecto de la catalasa es muy diferente en función del tipo de bacteria.

Tabla V.8. Pérdida de actividad antibacteriana al adicionar catalasa (2 mg/ml) a la disolución de las mieles de castaño (50% p/p) de Castilla-La Mancha.

Microorganismo	Zona de inhibición	Muestras de castaño	Diámetro de Inhibición, mm		Reducción de la actividad antibacteriana por la catalasa, %
			Sin catalasa	Con catalasa	
<i>S. aureus</i>	Halo interno	C1	12 ± 0	4 ± 1	64
		C2	11 ± 1	3 ± 1	71
		C3	13 ± 2	3 ± 1	75
		C4	11 ± 1	4 ± 1	59
<i>E. coli</i>	Halo interno	C1	4 ± 1	0	100
		C2	4 ± 1	0	100
		C3	3 ± 1	0	100
		C4	4 ± 1	0	100
	Halo externo*	C1	26 ± 1	26 ± 2	0
		C2	24 ± 1	24 ± 1	0
		C3	24 ± 0	24 ± 1	0
		C4	25 ± 0	25 ± 1	0

*No hay inhibición completa

En el caso de la cepa de *S. aureus*, la adición de catalasa a la disolución de miel, provoca que se reduzca el diámetro de inhibición. Esta reducción de la actividad antibacteriana está entre un 59% y un 75%, lo cual sugiere que la inhibición por la miel de castaño se debe principalmente al H₂O₂, pero que además de este factor hay otros componentes responsables de esta actividad remanente. Un factor antibacteriano importante que pudiera explicar este hecho es la presencia de lisozima. Como fue mencionado en el apartado anterior, se ha analizado el contenido de esta enzima en todos los tipos de miel, pero solo se ha logrado cuantificar en las mieles de castaño, con un valor medio de 19.42 mg/L. Este enzima explicaría, al menos en parte, que las mieles de castaño tengan una actividad antibiótica residual no-peróxido.

En cambio con la bacteria *E. coli*, cuando se adiciona catalasa a la disolución de miel, el halo interno de inhibición completa desaparece lo que indica que es el H_2O_2 el factor antibacteriano eficaz frente a este microorganismo. Y que aunque la miel contenga lisozima esta no es eficaz frente a esta bacteria ya que la lisozima pertenece a una clase de enzimas que lisan las paredes celulares de ciertas bacterias Gram-positivas, pero que son ineficaces frente a Gram-negativas (*E. coli*) [Mine et al., 2004], por lo tanto, la presencia de lisozima en la miel no impide el crecimiento de *E. coli*.

En cuanto al halo externo (donde no se produce una inhibición completa, únicamente una reducción en el crecimiento de *E. coli*) permanece inalterado al adicionar la catalasa. Esto lleva a pensar que esta semi-inhibición no es debida al H_2O_2 , posiblemente sea debida a factores físicos comunes a todos los tipos de miel, corroborando de este modo lo que se ha comentado en el apartado 4.2.2., ya que este fenómeno se observa en todas las mieles independientemente del tipo floral. Además como esta cepa no es osmotolerante, como pasa con *S. aureus* [Allen et al., 1991], su crecimiento sí que puede verse afectado por el factor físico de la osmolaridad de las disoluciones de miel.

4.3.4. Cálculo de la actividad antibacteriana de las mieles de Castilla La Mancha

Para la determinación de la actividad antibacteriana se ha utilizado como estándar de referencia un antiséptico, el fenol. El test de porcentaje de fenol equivalente se ha medido frente a *S. aureus* y *E. coli*, para comparar entre ambas cepas. En la tabla V.9 se detallan los resultados de este ensayo. Se observa que cuantitativamente la miel de castaño es más potente contra *S. aureus* que frente a *E. coli*, como ya se ha comentado en el apartado 4.3.2.

En general la actividad antibiótica es muy variable dependiendo fundamentalmente del origen floral. Según Allen et al. [1991], procesos externos como el envejecimiento de la miel o el procesado apícola parecen que no debilitan esta actividad. Estos investigadores llevaron a cabo un ensayo de determinación de la actividad antibacteriana mediante la técnica de fenol equivalente, con un gran número de muestras de miel de diferentes fuentes florales originarias de Nueva Zelanda. El

intervalo de concentraciones que obtuvieron fue de $\leq 2\%$ (p/v) a 58% (p/v) fenol equivalente, con una media de un 13.6% (p/v) para *S. aureus* ATCC 9144. Las fuentes florales con mayor potencial antibacteriano fueron las mieles de Kanuka, Manuka (ambas de la familia de las mirtáceas), las de brezo y las de Kamahi. Se analizaron también muestras de tomillo con unos resultados de actividad de 6.3% fenol equivalente, resultados que no se encuentran en las mieles de tomillo de la Alcarria en las que no se observó actividad antibacteriana frente a esta bacteria. Este trabajo es uno de los orígenes del establecimiento del factor UMF. Por otro lado, la cepa utilizada parece ser más susceptible que la utilizada en esta investigación (*S. aureus* ATCC 25923), según un estudio llevado a cabo con miel de abejas sin aguijón [Temaru et al., 2007]. Por lo cual el 9.5% (p/v) obtenido para las mieles de castaño, podría ser mayor si se hubiese trabajado con *S. aureus* ATCC 9144. En concordancia con la escala UMF (Unique Manuka Factor) aplicada a la industria de mieles de Nueva Zelanda, donde se considera que la eficacia antimicrobiana va de 0 (eficacia baja) a >20 (eficacia alta), un valor de aproximadamente 10% (p/v) fenol equivalente o UMF, podría ser una miel apropiada para uso medicinal [Unike Manuka Factor Honey association: <http://www.umf.org.nz/>; Wallace et al., 2009]. De acuerdo con esto, la miel de castaño producida en Castilla-La Mancha podría considerarse apropiada para el uso medicinal.

Tabla V.9. Resultados cuantitativos de la actividad antibacteriana de la miel de castaño de Castilla-La Mancha como equivalentes de fenol (%p/v).

Microorganismo	Muestra de castaño	Concentración fenol equivalente (%p/v) ± Desviación Estándar	
		Por muestra	Por microorganismo
<i>S. aureus</i>	C1	9.5 ± 0.4	10 ± 1
	C2	8.7 ± 0.4	
	C3	11 ± 2	
	C4	9 ± 2	
<i>E. coli</i>	C1	6.8 ± 0.1	6.8 ± 0.1
	C2	6.8 ± 0.1	
	C3	6.7 ± 0.1	
	C4	6.8 ± 0.1	

Por último, comparando los resultados de la tabla V.9 con los publicados por Chang et al. (2011) para 60 mieles chinas, se observa que son inferiores a estos frente a *S. aureus* ESA 40 con 16 mm de diámetro de inhibición (nuestras muestras como máximo dieron un diámetro de 13 mm) y superiores frente a *E. coli* DH5α con un máximo de inhibición de 18 mm (en nuestro caso fue de 26 mm, el halo externo). No es muy exacto comparar los resultados por el diámetro, pero no podemos compararlos con nuestros resultados en % (p/v) fenol equivalente, porque se ha utilizado kanamicin como patrón estándar.

4.4. Actividad antihipertensiva

Con este trabajo es la primera vez que se hace un estudio de actividad IECA en diferentes variedades de mieles. Sobre esta actividad solo se han encontrado dos investigaciones en mieles. En una de ellas se investiga si la miel de Tualang posee propiedades antihipertensivas. En un estudio *in vivo* con ratas [Erejuwa et al., 2012], pero únicamente con ese tipo de miel. Y el otro, es un estudio *in vitro* de la inhibición de la enzima convertidora de Angiotensina (IECA) de tres mieles de viborera a diferentes diluciones. Los autores encuentran que a la dilución más concentrada (50% v/v) la inhibición de la ECA es prácticamente total (94.2%).

De esta forma, la actividad inhibitoria que ejercen las muestras de miel en disolución (50% p/p) sobre la enzima convertidora de Angiotensina (ECA) se expresa como % de inhibición (% IECA). Como puede verse en la figura V.11 todos los tipos de miel muestran actividad IECA, pero con grandes variaciones entre muestras del mismo tipo de miel. Por ejemplo, la actividad IECA de romero varía de 32.32 a 50.85%; las de tomillo de 12.96 a 53.94%, las de espliego de 17.86 a 53.30% y las de castaño de 17.59 a 71.00%. Estas últimas destacaron como las más potentes, estando la mayoría de ellas por encima del 50% de actividad IECA (excepto la muestra C1).

Para la muestra de castaño de mayor actividad IECA, C3, se ha calculado su IC_{50} , es decir se ha analizado que concentración de miel producía una inhibición del 50% de la actividad de la enzima, que es una medida con la que podemos comparar con otros productos de actividad IECA [González-González et al., 2011]. El resultado obtenido ha sido de 80 mg/mL de miel. En comparación con otros productos alimenticios tales

como la leche fermentada, la cual tenía un valor de $IC_{50}=0.80-1.52$ mg/mL, este resultado es muy alto, lo que significa que la actividad IECA es baja. Aunque este resultado no es muy trascendente, en parte porque el IC_{50} se suele calcular sobre una molécula únicamente y no sobre un producto complejo.

En estudios recientes la actividad antihipertensiva de extractos de hojas y las sustancias derivadas de reacciones de Maillard, los melanoides se han podido correlacionar con la actividad antioxidante [Nho et al., 2010; Rufián-Henares & Morales, 2007].

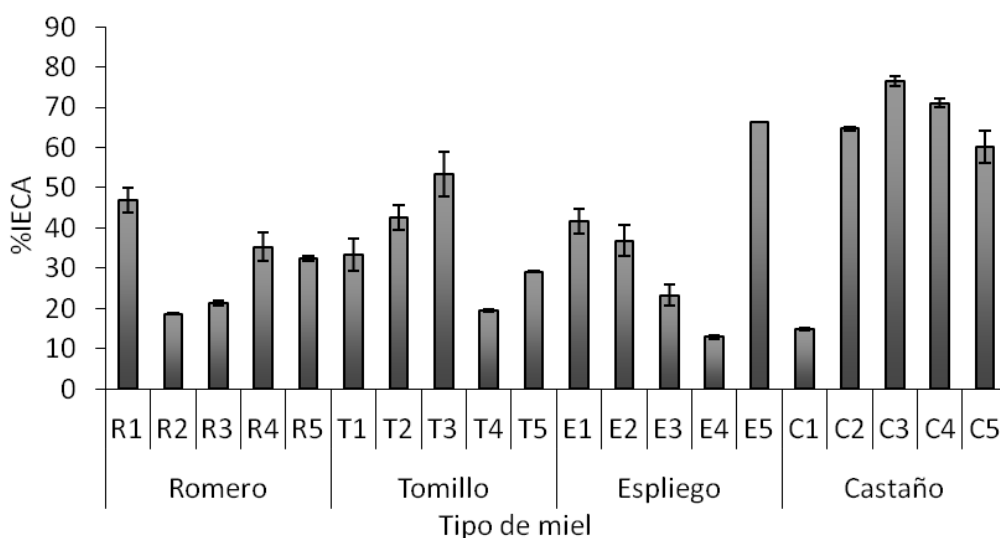


Figura V.11. Inhibición de la ECA (% IECA) agrupados por tipo de miel. Se representa la media y con las barras de error, la desviación estándar.

Con el fin de estudiar la posible relación entre la actividad antihipertensiva como %IECA y los parámetros antioxidantes, se ha realizado un análisis de regresión múltiple. Los valores de los coeficientes para cada variable con sus intervalos de confianza para un nivel de significación del 95% así como el p-valor para la influencia de las variables y para el análisis de varianza se recogen en la tabla V.10. En la figura

V.12 se representan los valores observados experimentalmente frente a los predichos por el modelo teórico.

Tabla V.10. Parámetros estadísticos de la regresión múltiple de %IECA frente a PT y vitamina C para un nivel de confianza del 95%

Parámetro	Coefficiente \pm intervalo confianza	P-valor	P-valor ANOVA
PT	0.5002 ± 0.1623	0.0000	0.0000
Vitamina C	-0.1542 ± 0.1992	0.1212	
%IECA = 0.5002 PT - 0.1542 Vitamina C			Ajuste ecuación 73.99 %

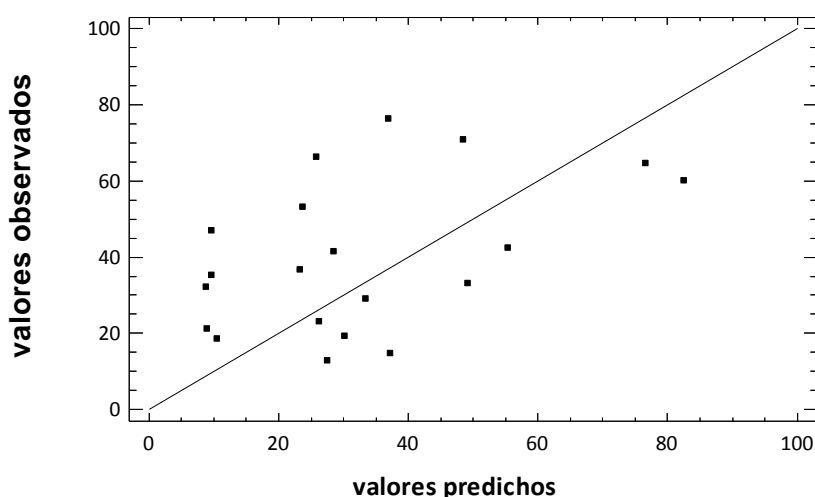


Figura V.12. Representación de los valores de %IECA observados experimentalmente frente a los predichos por el modelo teórico.

Como se observa en la tabla V.10, la variable PT tiene una influencia estadísticamente significativa en la ecuación teórica ya que el p-valor es 0.0000. Por el contrario, la vitamina C no tiene influencia estadísticamente significativa en dicha ecuación ya que su p-valor es 0.1212 y por tanto se puede eliminar del modelo. De hecho, si se elimina esta variable de la ecuación, la relación entre %IECA y los PT prácticamente no se modifica. Esto implica que la relación que se encuentra entre la actividad antihipertensiva y las variables antioxidantes es debida al contenido en polifenoles y la varianza de los datos puede ser explicada por el modelo teórico ya que

el p-valor de la tabla ANOVA es de 0.0000. Sin embargo, el porcentaje de ajuste de la variabilidad a la ecuación teórica (r^2 ajustada para los grados de libertad) es del 73.99%. Esto supone que existe una relación entre las variables pero el porcentaje de ajuste a la ecuación teórica en este caso no es muy elevado. Este hecho se observa en la figura V.12 donde se representan los valores de %IECA observados experimentalmente frente a los predichos por la ecuación teórica.

Si el análisis de regresión múltiple se realiza por pasos, el programa estadístico elimina la variable vitamina C y los valores estadísticos obtenidos se recogen en la tabla V.11. Como se puede observar en la figura 13, la representación de los valores observados para %IECA frente a los predichos por el modelo es similar al obtenido en el caso anterior.

Tabla V.11. Parámetros estadísticos de la regresión múltiple por pasos del %IECA frente a PT y vitamina C para un nivel de confianza del 95%.

Parámetro	Coefficiente \pm intervalo confianza	P-valor	P-valor ANOVA
PT	0.4161 ± 0.1255	0.0000	0.0000
%IECA = 0.4161 PT			Ajuste ecuación 71.74 %

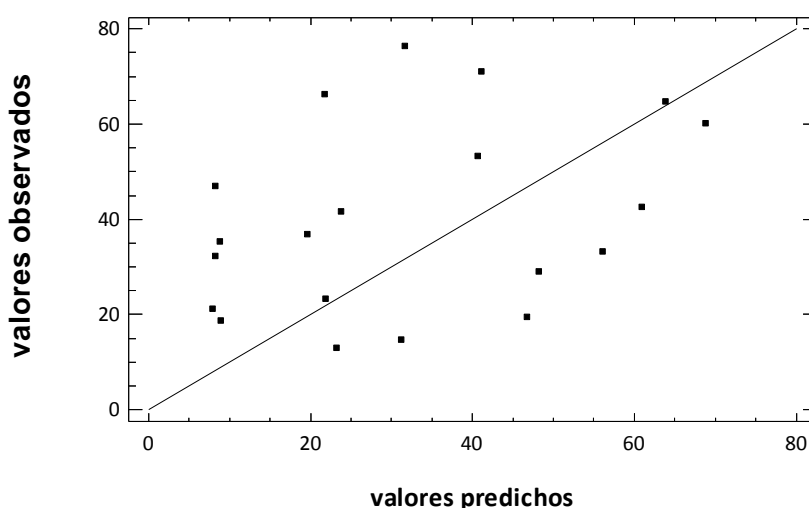


Figura V.13. Representación de los valores de %IECA observados experimentalmente frente a los predichos por el modelo teórico (regresión por pasos).

Los melanoides, mencionados anteriormente, son sustancias de coloración marrón que se forman en la última etapa de la reacción de Maillard, que se da entre los grupos amino de aminoácidos o proteínas y los grupos carbonilo de azúcares reductores. Con esta definición la miel parece ser un producto ideal para que se generen melanoides ya que posee una alta concentración de azúcares reductores (glucosa y fructosa) y una amplia variedad de aminoácidos libres y proteínas. De hecho, el pardeamiento enzimático es frecuente durante el almacenaje prolongado de la miel, pero la información de la presencia y de la actividad biológica de los melanoides en miel es muy escasa [Brudzynski, & Miotto, 2011]. Rufián-Henares & Morales [2007] encontraron que estos compuestos tienen, entre otras propiedades funcionales, actividad antihipertensiva. Sería interesante estudiar en futuras investigaciones si estos compuestos pudieran ser también responsables de la actividad antihipertensiva en la miel.

5. CONCLUSIONES

1. El origen botánico de la miel es clave a la hora de cuantificar sus propiedades funcionales, así no todas las mieles son antibacterianas y su potencial antioxidante o antihipertensivo va a ser muy variable dependiendo de la composición química de la miel.
2. La miel de tomillo producida en la región de la Alcarria, tiene un gran potencial antioxidante, principalmente por sus elevados niveles de vitamina C pero también por el alto contenido en polifenoles. A continuación las mieles de castaño y mielato, pero en este caso el efecto es producido principalmente por los polifenoles presentes en estos tipos de mieles. El resto de mieles: romero, espliego y viborera, de color más claro y por lo tanto de contenido fenólico más bajo, tienen un potencial antioxidante bastante menor.
3. En cuanto a la actividad antibacteriana, solo las mieles de castaño parecen poseer esta propiedad, tanto frente a *E. coli* como a *S. aureus*, y más enérgica frente a esta última. Este efecto para *S. aureus* es debido tanto a la presencia en la miel de H_2O_2 como de lisozima, en cambio para *E. coli* únicamente actúa H_2O_2 . El resto de mieles solo dan inhibición parcial frente a *E. coli* y esto parece

ser debido a los factores físicos intrínsecos de la miel (osmolaridad) no dependientes del origen botánico.

4. Finalmente, este estudio es el primero que se lleva a cabo en cuando a actividad antihipertensiva, en términos de inhibición de IECA por la miel, en diferentes variedades florales, resolviendo que aunque todas poseen actividad antihipertensiva, son las mieles de castaño, de nuevo, las que producen una mayor inhibición, aunque el IC_{50} es muy alto por lo tanto de eficacia leve. El responsable de esta característica parece ser el contenido de polifenoles, descartando la influencia de la vitamina C.

CAPÍTULO VI:

Conclusiones finales

Del conjunto de resultados recogidos en esta memoria se establecen las siguientes conclusiones finales:

1. Mediante la metodología clásica utilizada en el ámbito del análisis de miel, es decir, el estudio de los perfiles físico-químicos, sensoriales y palinológicos, se han tipificado varias mieles monoflorales de Castilla-La Mancha. Por vez primera se ha caracterizado la miel de castaño producida en la Sierra de San Vicente (Toledo), la miel de tomillo de la comarca de la Alcarria (Guadalajara), la miel de viborera producida en una amplia extensión de las provincias de Toledo y Ciudad Real, y el mielato de encina, recolectado en la provincia de Guadalajara. También se han ampliado los estudios sobre tipificación de las reconocidas mieles monoflorales de la Alcarria, espliego y romero, que no fueron estudiadas individualmente en investigaciones anteriores.
2. La vitamina C, potente antioxidante presente en todas las mieles analizadas, es de especial interés en las mieles de tomillo, cuyo valor medio es muy elevado, pudiéndose utilizar además, como un marcador químico de este tipo de miel.
3. Se ha observado que la vitamina C que contiene la miel, es muy estable si conservamos el producto en refrigeración o en congelación. En cambio, si se almacena a temperatura ambiente sufre grandes pérdidas, en torno a un 70% en un año.

Capítulo VI. Conclusiones finales.

4. Las características físico-químicas de cada variedad de miel, el contenido en azúcares mayoritarios y en vitamina C, se han utilizado para discriminar las mieles de acuerdo a su origen botánico. Los datos de conductividad eléctrica, fructosa, glucosa y vitamina C permiten un 78.1% de correcta clasificación.
5. Se ha desarrollado un método de cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC) y modo isocrático, para la separación y determinación de siete vitaminas hidrosolubles, la vitamina C y varias vitaminas del grupo B: tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), ácido nicotínico (vitamina B₃H), nicotinamida (vitamina B₃N), ácido pantoténico (vitamina B₅) y piridoxina (vitamina B₆).
 - 5.1. La separación cromatográfica de las vitaminas **B₁, B₃H, B₃N, B₅, B₆ y C** se puede llevar a cabo con una fase móvil acuosa H₂SO₄ 0.01%/MeOH 2%/pH 3.5/25⁰C en 12 minutos.
 - 5.2. La presencia de CTAB 0.01 M en la fase móvil, CTAB 0.01 M/H₂SO₄ 0.01%/MeOH 2%/pH 2.75/25⁰C permite la separación de las vitaminas **B₁, B₂, B₃H, B₃N, B₆ y C** en 7 minutos.
6. Se han analizado las muestras de miel de los seis tipos botánicos estudiados mediante la metodología de RP-HPLC desarrollada. En la mayor parte de las mieles se ha encontrado ácido nicotínico (vitamina B₃H) y nicotinamida (vitamina B₃N). La vitamina B₁ o tiamina se ha podido cuantificar en la mayoría de las muestras excepto, en las mieles de romero. En cambio, la vitamina B₂ solo ha sido detectada en las mieles más oscuras, las de castaño y mielato. La vitamina B₅ es detectada en muy pocas muestras. En cuanto a la vitamina B₆, se detecta en más de la mitad de las muestras analizadas, pero en cantidades no cuantificables.
7. Se ha realizado una comparación de los resultados obtenidos con la Cantidad Diaria Recomendada (CDR) de ingesta de estos nutrientes en un adulto. En relación con esta comparativa se aprecia que las mieles de castaño, mielato, tomillo y viborera se caracterizan por ser ricas en tiamina (vitamina B₁), llegando incluso a poder ser consideradas como alimento con *alto contenido* de esta

vitamina. También la miel de tomillo se puede considerar una *fente* de vitamina C e incluso, en muchas de las muestras analizadas, como un alimento con *alto contenido* de esta vitamina. Respecto al resto de vitaminas analizadas los niveles encontrados han sido muy bajos.

8. Se han investigado algunas propiedades funcionales (actividad antioxidante, antibacteriana y antihipertensiva) que pudieran poseer las mieles monoflorales producidas en Castilla-La Mancha.

- 8.1. Las mieles que destacaron por su alta **actividad antioxidante** fueron, las de tomillo, en primer lugar, seguida por las de castaño. La primera variedad debe su actividad a la alta concentración de vitamina C, presente en unos niveles en torno a 10-30 veces superiores al resto de tipos de miel, y al contenido en polifenoles totales. En el caso de las mieles de castaño parece que el componente responsable de dicha actividad es su elevado nivel de polifenoles totales.

- 8.2. En cuanto a la **actividad antibacteriana**, solo las mieles de castaño desarrollan una potente actividad frente a *E. coli* y *S. aureus*. Se observó un modo de actuación diferente frente a cada tipo de bacteria. Frente a *E. coli* solo fue eficaz el peróxido de hidrógeno producido de manera endógena en la miel. En cambio, contra *S. aureus* actuaba de forma sinérgica, junto con el peróxido de hidrógeno, la lisozima que contienen las mieles de castaño, enzima que apenas es detectable en los otros tipos de miel.

- 8.3. Es la primera vez que la **actividad antihipertensiva** de diferentes fuentes florales de miel es investigada, obteniéndose prometedores resultados en todos los tipos de mieles estudiados. Destaca de nuevo, con una mayor actividad, la miel de castaño. En una primera aproximación, se cree que es la cantidad de polifenoles totales presentes la responsable de la actividad antihipertensiva.

CAPÍTULO VII:

Bibliografía

Acquarone, C., Buera, P., Elizalde, B. (2007). Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry*, 101, 695-703.

Adam, C. J., Boulton, C. H., Deadman, B. J., Farr, J. M., Grainger, M. N. C., Manley-Harries, M., Snow, M. J. (2008). Isolation by HPLC and characterization of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate Research*, 343, 651–659.

AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). (2012). La hipertensión arterial en España. Necesidad de intervenir. Recuperado el 10 de enero de 2013. http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/notas_prensa/hipertension_arterial.shtml.

Ahmed, M., Djebli, N., Hammoudi, S., Aissat, S., Akila, B., Hemida, H. (2012). Additive potential of ginger starch on antifungal potency of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 253-255.

Al, M. L., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L., Bogdanov, S. (2009). Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, 112, 863-867.

Albalá-Hurtado, S., Veciana-Nogues, M. T., Izquierdo-Pulido, M., Marine-Font, A. (1997) Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 778, 247-253

Capítulo VII. Bibliografía

Al Somal, N., Coley, K. E., Molan, P. C., Hancock, B. M. (1994). Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of Manuka honey. *The Royal Society of Medicine*, 87, 9-12.

Ali, A. T. M. M., Chowdhury, M. N. H., Al-Humayyd, M. S. (1991). Inhibitory effect of natural honey on *Helicobacter pylori*. *Tropical Gastroenterology*, 12, 139-143.

Aliferis, K. A., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., Alissandrakis, E. (2010). Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds. *Food Chemistry*, 121, 856-862.

Alissandrakis, E., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., Polissiou, M. (2007). Comparison of the volatile composition in thyme honeys from several origins in Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8152-8157.

Aljadi, A. M., Yusoff, K. M. (2003). Isolation and Identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 33, 229-236.

Al-Khalifa, A. S., Al-Arif, I. A. (1999). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Saudi honeys. *Food Chemistry*, 67, 21-25.

Allen, K. L., Molan, P. C., Reid, G. M. (1991). A survey of the antibacterial of some New Zealand honeys. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43, 817-822.

Almagro, I., San Andrés, M. P., Vera, S. (2002). Determination of water-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by RP-HPLC with a mobile phase containing SDS and n-propanol. *Chromatographia*, 55, 185-188.

Al-Mamary, M., Al-Meer, A., Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22, 1041-1047..

Álvarez-Suárez, J. M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S., Battino, M. (2010a). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2490-2499.

Álvarez-Suárez, J. M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., Battino, M. (2010b). Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *The Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3, 15–23.

Alves, A., Ramos, A., Gonçalves, M., Bernardo, M., Mendes, B. (2013). Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *Journal of Food Composition and Analysis*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2013.02.009>.

Al-Waili, N. S., Boni, N. S. (2003). Natural honey lowers plasma prostaglandin concentrations in normal individuals. *Journal of Medical Food*, 6, 129-133.

Alzahrani, H. A., Alsabehi, R., Boukraâ, L., Abdellah, F., Bellik, Y., Bakhotmah, B. A. (2012). Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins. *Molecules*, 17, 10540-10549.

Amoore, J. E., Venstrom, D. (1966). Sensory analysis of odor qualities in terms of the stereochemical theory. *Journal of Food Science*, 31, 118-128.

Ampuero, S., Bogdanov, S., Bosset, J. (2004). Classification of unifloral honeys with an MS-based electronic nose, using different sampling modes: SHS, SPME and INDEX. *European Food Research Technology*, 218, 194-207.

Andrade, P., Ferreres, F., Amaral, M. T. (1997a). Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 20, 2281–2288.

Andrade, P., Ferreres, F., Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A. (1997b). Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*, 60, 79-84.

Andrés-Lacueva, C., Mattivi, F., Tonon, D. (1998). Determination of riboflavin, flavin mononucleotide and flavin–adenine dinucleotide in wine and other beverages by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 823, 355–363.

Andrisano, V., Bartolini, M., Bertucci, C., Cavrini, V., Luppi, B., Cerchiara, T. (2003). Analytical methods for the determination of folic acid in a polymeric micellar carrier. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32, 983-989.

Capítulo VII. Bibliografía

Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63, 549 – 562.

AOAC (2005). Official Method 967.21: Ascorbic acid in vitamin preparations and juices. In Horwitz, W. & Latimer, G.W. (Eds.), *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Gaithersburg (Maryland), EEUU.

Aparicio, A., San Andrés, M. P., Vera, S. (2000). Separation and determination of phenolic antioxidants by HPLC with surfactant/n-propanol mobile phases. *Journal of High Resolution Chromatography*, 23, 324-328.

Argoudelis, C.J. (1997). Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of all seven vitamin B₆ -related compounds. *Journal of Chromatography A*, 790, 83–91.

Armstrong, D. W., Nome, F. (1981). Partitioning behavior of solutes eluted with micellar mobile phases in liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 53, 1662-1666.

Arráez-Román, D., Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutierrez, A. (2006). Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1648-1656.

Arunyanart, M., Cline-Love, L. J. (1985). Influence of micelles on partitioning equilibria of ionizable species in liquid chromatography: pH and ionic strength effects, *Analytical Chemistry*, 57, 2837-2843.

Arvanitoyannis, I. S., Chalhoub, C., Gotsiou, P., Lydakis-Simantiris, N., Kefalas, P. (2005). Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 193–203.

Aubert, S., Gonnet, M. (1983). Mesure de la couleur des miels. *Apidologie*, 14, 105-118.

Ávila, M., González-Crevillén, A., González, M. A., Escarpa, A., Vela-Hortigüela, L., Lorenzo-Carretero, C., Pérez-Martín, R. A. (2006). Electroanalytical approach to evaluate antioxidant capacity in honeys: proposal of an antioxidant index. *Electroanalysis*, 18, 1821-1826.

Bahrami, A.M., Kakekhani, S., Hamounnavard, S., Doosti, A., Asbchin, S.A. (2011). Compare the therapeutic effect of honey on cutaneous leishmaniasis in the laboratory and human by Glucantim. *Journal of Veterinary Medicine*, 5, 43 -48.

Baroni, M. V., Chiabrando, G. A., Costa, C., Wunderlin, D. A. (2002). Assessment of the floral origin of honey by SDS-page immune blot techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1362–1367.

Bartolomé Esteban, C., Rejos Esteban, F. J., Álvarez Jiménez, J. (2002). Flora y vegetación de la Baja Alcarria de Guadalajara. Ed. UNIÓN FENOSA. Madrid, España.

Basova, E. M., Ivanov, V.M., Shpigun, O.A. (1999). Micellar liquid chromatography. *Russian Chemical Reviews*, 68, 983-1000.

Benedetti, S., Mannino, S., Sabatini, A., Marcazzan, G. (2004). Electronic nose and neural network use for the classification of honey. *Apidologie*, 35, 397-402.

Bendryshev, A.A., Pashkova, E. B., Pirogov, A. V., Shpigun, O.A. (2010). Determination of water soluble vitamins in vitamin premixes, bioactive dietary supplements, and pharmaceutical preparations using high efficiency liquid chromatography with gradient elution. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 65, 260–268.

Berahia, T., Cerrati, C., Sabatier, S., Amiot, M. J. (1993). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids in honey. *Science des Aliments*, 13, 15-24.

Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Facino, R. M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533, 185–191.

Bernal, J., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., Cifuentes, A. (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 758–774

Berthod, A. (1997). Causes and remediation of reduced efficiency in micellar liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 780, 191-206.

Berton, P., Monasterio, R.P., Wuilloud, R.G. (2012). Selective extraction and determination of vitamin B₁₂ in urine by ionic liquid-based aqueous two-phase system prior to high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 97, 521-526.

Capítulo VII. Bibliografía

Bertoncelj, J., Dobersšek, U., Jamnik, M., Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105, 822-828.

Blake, C.J. (2007). Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 63-76.

BOE nº193 de 13 de agosto de 1983. Orden de 5 de agosto, por la que se aprueba la norma de calidad para la miel destinada al mercado interior.

BOE nº145 de 18 de junio de 1986. Orden de 12 de junio, por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis de la miel.

BOE nº270 de 11 de noviembre de 1993. Orden de 3 de noviembre de 1993, por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen "Miel de la Alcarria" y su Consejo Regulador

BOE nº186 de 5 de agosto de 2003. Real Decreto 1049/2003 de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad de la miel.

BOE nº244 de 9 de octubre de 2009. Real Decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios.

BOE nº299 de 9 de diciembre de 2010. Resolución de 10 de noviembre de 2010, por la que se concede la protección nacional transitoria a la modificación de la Denominación de Origen Protegida «Miel de La Alcarria».

Bogdanov, S. (1984). Characterisation of antibacterial substances in honey. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 17, 74–76.

Bogdanov, S. (1997). Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *LWT - Food Science and Technology*, 30, 748–753.

Bogdanov, S. (2002). Harmonised methods of the European Honey Commission. Recuperado el 22 de febrero de 2013 de http://www.apiculturacluj.com/ApiculturaCluj/italiano/Documents/IHCmethods_e.pdf

Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *American Journal of the College of Nutrition*, 27, 677-689.

Bogdanov, S., Lüllmann, C., Martin, P. (1999). Honey quality and international regulatory standards: review of the work of the International Honey Commission. *Mitteilungen aus dem Gebieteder Lebensmittel Untersuchungund-Hygiene*, 90, 108-125.

Bogdanov, S., Martin, P. (2002). Honey authenticity: a review. *Mitteilungen aus dem Gebieteder Lebensmittel-Untersuchungund-Hygiene*, 93, 232-254. Recuperado el 27 de junio de 2012 de <http://www.agroscope.admin.ch/aktuell/index.html?lang=de>.

Bogdanov, S., Ruoff, K., Persano Oddo, L. (2004). Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 35, S4-S17.

Bourne, I. H. J. (1991). Honey and the healing of leg ulcers. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 84 (11), 693-694.

Bouseta, A., Collins, S., Dufour, J. P. (1992). Characteristic aroma profiles of unifloral honeys obtained with a dynamic head-space GC-MS system. *Journal of Apicultural Research*, 31, 96-109.

Bouseta, A., Scheirman, V., Collin, S. (1996). Flavor and free amino acid composition of lavender and eucalyptus honeys. *Journal of Food Science*, 61, 683-687.

Breithaupt, D.E. (2001). Determination of folic acid by ion-pair RP-HPLC in vitamin-fortified fruit juices after solid-phase extraction. *Food Chemistry*, 74, 521-525.

Brudzynski, K., Miotto, D. (2011). The recognition of high molecular weight melanoidins as the main components responsible for radical-scavenging capacity of unheated and heat-treated Canadian honeys. *Food Chemistry*, 125, 570-575.

Bueno Castellote, E. (1987). Flora de interés apícola de la provincia de Guadalajara. Ed. Excma. Diputación Provincial de Guadalajara. Guadalajara, España.

Burini, G. (2007). Development of a quantitative method for the analysis of total L-ascorbic acid in foods by HPLC. *Journal of Chromatography A*, 1154, 97-102.

Buszewski, B., Zbanyszek, W. (2002). Determination of different solubility vitamins in pharmaceutical preparations. I. HPLC column switching. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technology*, 25, 1229-1241.

Capítulo VII. Bibliografía

Buttery, B. G., Turnbaugh J. G., Ling, L. C. (1988). Contribution of volatiles to rice aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36 (5), 1006-1009.

Capella-Peiró, M. E., Carda-Broch, S., Monferrer-Pons, L., Esteve-Romero, J. (2004). Micellar liquid chromatographic determination of nicotinic acid and nicotiamide after precolumn Könic reaction derivatization. *Analytica Chimica Acta*, 517, 81-87.

Carretero, J. (1989). Análisis polínico de la miel. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España.

Carvalho, C. A., Sodr , G. S., Fonseca, A. A., Alves, R. M., Souza, B. A., Clarton, L. (2009). Physicochemical characteristics and sensory profile of honey samples from stingless bees (Apidae: Meliponinae) submitted to a dehumidification process. *Anais da Academia Brasileira de Ciências (Annals of the Brazilian Academy of Sciences)*, 81(1), 143-149.

Castro, R. N., Azeredo, L. C., Azeredo, M. A. A., Sampaio, C. S. T. (2001). HPLC assay for determination of ascorbic acid in honey samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24, 1015-1020.

Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. S., de Torres, C., Pérez-Coello, M. S. (2010). Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys. *Food Research International*, 43, 2335–2340.

Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., Guchu, E., Pérez-Coello, M. S. (2006). Analysis of volatile compounds of eucalyptus honey by solid phase extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 224, 27-31.

Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., González-Viñas, M. A., Pérez-Coello, M. S. (2009). Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry*, 112, 1022-1030.

Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M., Pérez-Coello, M. (2007). Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. *Food Chemistry*, 103, 601-606.

Chang, X., Wang, J., Yang, S., Chen, S., Song, Y. (2011). Antioxidative, antibrowning and antibacterial activities of sixteen floral honeys. *Food & Function*, 2, 541-546.

Chatzimichalakis, P.F., Victoria F. Samanidou, V.F., Robert Verpoorte, R., Papadoyannis, I.N. (2004). Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction. *Journal of Separation Science*, 27, 1181–1188.

Chen, L., Mehta, A., Berenbaum, M., Zangerl, A. R., Engeseth, N. J. (2000). Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4997-5000.

Chen, P., Wolf, W.R. (2007). LC/UV/MS-MRM for simultaneous determination of water soluble vitamins in multivitamin dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 2441-2448.

Chen, P., Atkinson, R., Wolf, W.R. (2009). Single-laboratory validation of a high performance liquid chromatographic diode array detector-fluorescence detector-mass spectrometric method for simultaneous determination of water soluble vitamins in multivitamin dietary tablets. *Journal of AOAC International*, 92, 680-687.

Cheong, W. J., Kang, G. W., Lee, W. I., Jong-Shin, J. (2002). Rapid determination of water-soluble B group vitamins in urine by gradient LC/MS with a disposable home-made microcolumn. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 25, 1367-1378.

Cho, C. M., Ko, J. H., Cheong, W. J. (2000). Simultaneous determination of water-soluble vitamins excreted in human urine after taking an overdose of vitamin pills by a HPLC method coupled with a solid phase extraction. *Talanta*, 51, 799-806.

CIE (1986). Colorimetry, 2nd Ed. Publication Commission Internationale de l'Eclairage nº 15.2. Viena, Austria.

Cimpoi, C., Hosu, A., Miclaus, V., Puscas, A. (2013). Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 100, 149–154.

Capítulo VII. Bibliografía

Ciulu, M., Solinas, S., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, M.I., Piu, P. C., Spano, N., Sanna, G. (2011). RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, 83, 924-929.

Codex Alimentarius (2001). Alinorm 41/0: Revised standard for honey, Alinorm 1, 19-26.

Collazos Padrino, B., Gómez Romero, F. (2010). Guía de plantas silvestres. Flora de la Alcarria. Ed. ATyPE, S.L. Guadalajara, España.

Cometto, P. M., Faye, P. F., Paola, R. D., Naranjo, R. D. D. P., Rubio, M. A., Aldao, M. A. J. (2003). Comparison of free amino acids profile in honey from three Argentinean regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5079–5087.

Conti, M. E. (2000). Lazio region (central Italy) honeys: a survey of mineral content and typical quality parameters. *Food Control*, 11, 459-463.

Conti, M. E., Stripeikis, J., Campanella, L., Cucina, D., Tudino, M. B. (2007). Characterization of Italian honeys (Marche Region) on the basis of their mineral content and some typical quality parameters. *Chemistry Central Journal*, 1, 14-23.

Cotte, J. F., Casabianca, H., Chardon, S., Lheritier, J., Grenier-Loustalot, M. F. (2004a). Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisation of monofloral honey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380, 698–705.

Cotte, J. F., Casabianca, H., Giroud, B., Albert, M., Lheritier, J., Grenier-Loustalot, M. F. (2004b). Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 1342–1350.

Crane, E. (1975). Honey: A comprehensive survey. International Bee Research Association (IBRA). Ed. Heinemann. Londres, Reino Unido.

Cuevas-Glory, L., Pino, J., Santiago, L., Sauri-Duch, E. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 102, 1032-1043.

Cullere, L., Escudero, A., Cacho, J., Ferreira, V. (2004). Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1653-1660.

Cushnie, T. P., Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.

Da Silva, V. L., Rodrigues Facchini Cerqueira, M., Lowinsohn, D., Costa Matos, M. A., Camargo Matos, R. (2012). Amperometric detection of ascorbic acid in honey using ascorbate oxidase immobilised on amberlite IRA-743. *Food Chemistry*, 133, 1050-1054.

De Alda-Garcilope, C., Gallego-Picó, A., Bravo-Yagüe, J. C., Garcinuño-Martínez, R. M., Fernández-Hernando, P. (2012). Characterization of Spanish honeys with protected designation of origin “Miel de Granada” according to their mineral content. *Food Chemistry*, 135, 1785–1788.

De la Fuente, E., Martínez-Castro, I., Sanz, J. (2005). Characterization of Spanish unifloral honeys by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 28, 1093-1100.

De la Fuente, E., Valencia-Barrera, R. M., Martínez-Castro, I., Sanz, J. (2007a). Occurrence of 2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone and 3-hydroxy-5-methyl-2-hexanone as indicators of botanic origin in eucalyptus honeys. *Food Chemistry*, 103, 1176-1180.

De la Fuente, E., Sanz, M. L., Martínez-Castro, I., Sanz, J., Ruiz-Matute, A. I. (2007b). Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. *Food Chemistry*, 105, 84-93.

De Lorenzo, C. (2002). La miel de Madrid. Consejería de Economía e Innovación Tecnológica (Ed.), Comunidad de Madrid, España.

Devillers, J., Morlot, M., Pham-Delegue, M. H., Doré, J. C. (2004). Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chemistry*, 86, 305-321.

Díaz Ara, R. C., Fernández Romera, D. (1998). Determinación de algunos parámetros de calidad de la miel en la provincia de Huesca. *Lucas Mallada*, 10, 107-122.

Dinç, E., Kökdil, G., Onur, F. (2000). A comparison of matrix resolution method, ratio spectra derivative spectrophotometry and HPLC method for the determination of thiamine HCl and pyridoxine HCl in pharmaceutical preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22, 915–923.

Capítulo VII. Bibliografía

Di Stefano, V., Avellone, G., Bongiorno, D., Cunsolo, V., Muccilli, V., Sforza, S., Dossena, A., Drahos, L., Vékey, K. (2012). Applications of liquid chromatography–mass spectrometry for food analysis. *Journal of Chromatography*, 1259, 74-85.

Donner, L. W. (1977). The sugar of honey. A review. *Journal of Science and Food Agricultural*, 28, 443-456.

Dorsey, J.G., De Echegaray, M.T., Landy, J.S. (1983). Efficiency enhancement in micellar liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 55, 924-928.

DOUE L 10/47 de 12 de enero de 2002. Directiva 2001/110/CE del Consejo, relativa a la miel.

DOUE L 15/1 de 20 de enero de 2010. Reglamento (UE) Nº 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal.

DOUE L 285/9 de 29 de octubre de 2008. Directiva 2008/100/CE de la Comisión, por la que se modifica la Directiva 90/496/CEE del Consejo, relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, en lo que respecta a las cantidades diarias recomendadas, los factores de conversión de la energía y las definiciones.

DOUE L 338/1 de 22 de diciembre de 2005. Reglamento (UE) Nº 2073/2005 de la Comisión, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

DOUE L 404/9 de 30 de diciembre 2006. Reglamento (CE) Nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.

Dutcher, R. A. (1918). Vitamin studies.III. Observation on the curative properties of honey nectar and corn pollen in avian polyneuritis. *Journal of Biological Chemistry*, 36, 551-555.

Ekinci, R., Kadakal, Ç. (2005). Determination of seven water-soluble vitamins in tarhana, a traditional turkish cereal food, by HPLC. *Acta Chromatographica*, 15, 289-297.

Elfalleh, W., Nasri, N., Hannachi, H., Tlili, N., Ying, M., Ferchichi, A. (2011). Water-soluble vitamins from Chinese and tunisian pomegranate (*punica granatum* L.) fruits. *Italian Journal of Food Science*, 23, 373-380.

Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Ab Wahab, M. S. (2012a). Honey: a novel antioxidant. *Molecules*, 17, 4400-4423.

Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Ab Wahab, M. S., Sirajudeen, K. N. S., Salleh, M., Gurtu, S. (2012). Honey supplementation in spontaneously hypertensive rats elicits antihypertensive effect via amelioration of renal oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1-14.

Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borrás, M., Domenech, E. (2011). Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys. *Food Research International*, 44, 1504-1513.

Escuredo Pérez, O. (2012). Origen botánico y composición nutricional de la miel producida en Galicia. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo, España.

Escuredo, O., Fernández-González, M., Seijo, M. C. (2012). Differentiation of blossom honey and honeydew honey from northwest Spain. *Agriculture*, 2, 25-37.

Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., Seijo, M. C. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry*, 138, 851-856.

Esteve-Romero, J., Capellá-Peiró, M.E., Monferrer-Pons, L., Gil-Agustí, M. (2004). Micellar liquid chromatography in clinical chemistry: application to the monitorization of B₆ vitamins. *Clinica Chimica Acta*, 348, 69-77.

Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3774-3779.

Esteve, M.J., Farré, R., Frígola, A., García-Cantabella, J.M. (1998). Determination of vitamin B₆ (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) in pork meat and pork meat products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 795, 383-387.

Capítulo VII. Bibliografía

Etzold, E., Lichtenberg-Kraag, B. (2008). Determination of the botanical origin of honey by Fourier-transformed infrared spectroscopy: an approach for routine analysis. *European Food Research and Technology*, 227, 579-586.

FAO, 2012. Recuperado el 23 de abril de 2013 de: <http://faostat.fao.org/site/354/default.aspx>.

Fell, R. D. (1978). The color grading of honey. *American Bee Journal*, 118, 782-789

Fernández-Torres, R., Pérez-Bernal, J. L., Bello-López, M. A., Callejón-Mochón, M., Jiménez-Sánchez, J. C., Guirum-Pérez, A. (2005). Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta*, 65, 686-691.

Ferrazzi, P. (1992). Caratterizzazione dei mieli. Analisi melissopalynologiche. *L'Apicoltore moderno*, 83(4), 129-138.

Ferreira, I. C. F. R., Aires, E., Barreira, J. C. M., Estevinho. L. M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114, 1438-1443.

Ferreres F., Ortiz A., Silva C., García-Viguera C., Tomás-Barberán F.A. Tomás-Lorente F. (1992). Flavonoids of "La Alcarria" honey – a study of their botanical origin. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 194, 139-143.

Ferreres, F., García-Viguera, C., Tomás-Lorente, F., Tomás-Barberán, F. A. (1993). Hesperetin: a marker of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61, 121-123.

Fitzgerald, R.J., Murray, B.A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 118-125.

Font Quer, P. (2003). Plantas medicinales: el Dioscórides renovado. 5ª edición. Ed. Península. Barcelona, España.

Frías, I., Rubio, C., González-Iglesias, T., Gutiérrez, A. J., González-Weller, D., Hardisson, A. (2008). Metals in fresh honeys from Tenerife island, Spain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80, 30-33.

García Álvarez, M., Ceresuela, S., Huidobro, J. F., Hermida, M., Rodríguez Otero, J. L. (2002). Determination of polarimetric parameters of honey by near-infrared transfectance spectroscopy. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50, 419-425.

García, L., Blázquez, S., San Andrés, M. P., Vera, S. (2001). Determination of thiamine, riboflavin and pyridoxine in pharmaceuticals by synchronous fluorescence spectrometry in organized media. *Analytical Chimica Acta*, 434, 193-199.

Garmonov, S.Y., Salakhov, I. A., Nurislamova, G. R., Ismailova, R. N., Irtuganova, É. A., Sopin, V.F. (2011). Assay of ascorbic acid, thiamine, riboflavin, nicotinamide, and pyridoxine in "HEXAVIT" by HPLC. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 45, 440-443.

Gatti, R., Gioia, M.G. (2005). Liquid chromatographic determination with fluorescence detection of B₆ vitamers and riboflavin in milk and pharmaceuticals. *Analytica Chimica Acta*, 538, 135-141.

Gheldof, N., Engeseth, N. J. (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3050-3055.

Gheldof, N., Wang, X., Engeseth, N. J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5870-5877.

Ghorbani, A. R., Momenbeik, F., Khorasani, J. H., Amini, M. K. (2004). Simultaneous micellar liquid chromatographic analysis of seven water-soluble vitamins: optimization using super-modified simplex. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, 439-444.

Gidamies, A. B., Chove, B. E., Shayo, N. B., Nnko, S. A., Bangu, N. T. (2004). Quality evaluation of honey harvested from selected areas in Tanzania with special emphasis on hydroxymethyl furfural (HMF) levels. *Plant Foods for Human Nutrition, summer*, 59 (3), 129-132.

Gil, M. A., Ortiz Valbuena, A., Subrá, E., Tomás Barberán, F. A. (1995). Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2833-2838.

Capítulo VII. Bibliografía

Giorgi, A., Madeo, M., Baumgartner, J., Lozzia, G. C. (2011). The relationships between phenolic content, pollen diversity, physicochemical information and radical scavenging activity in honey. *Molecules*, 16, 336-347.

Gliszczynska-Świątło, A., Koziółowa, A. (2000). Chromatographic determination of riboflavin and its derivatives in food. *Journal of Chromatography A*, 881, 285–297.

Gómez-Pajuelo, A. (1996). Parámetros comerciales de calidad. Conductividad eléctrica, acidez y tixotropía. *Vida Apícola*, 77, 49-52.

Gómez-Pajuelo, A., Courty, F. (2010). Composición físico-química, melisopalínológica y sensorial de las mieles de Cuenca, cosecha 1998. VI Congreso nacional de apicultura, Libro de actas p.21.

Gómez-Pajuelo, A., Orantes, F. J. (2010). Composición físico-química y melisopalínológica de las mieles de la Sierra Norte de Madrid, cosecha 2000. VI Congreso nacional de apicultura, Libro de actas p.22.

González-González, C. R., Tuohy, K. M., Jauregi, P. (2011). Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 21, 615-622.

González, M., de Lorenzo, C., Pérez, R. A. (2008). Sensory attributes and antioxidant capacity of Spanish honeys. *Journal of Sensory Studies*, 23, 293–302.

González-Miret, M. L., Terrab, A., Herranz, D., Fernández-Recamales, M. A., Heredia, F. J. (2005). Multivariate correlation between color and mineral composition of honey and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2574-2580.

González-Paramás, A. M., Gómez-Bárez, J. A., García-Villanova, R. J., Rivas-Palá, T., Ardanuy-Albajar, R., Sánchez-Sánchez, J. (2000). Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 157-165.

González-Porto, A. V., León-Ruiz, V., Quintana, A. R., Quiñones, F. (2008). Correlación de métodos colorimétricos en mieles. XIII Congreso Anual en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Madrid, España.

Gorjanović, S. Ž., Álvarez-Suárez, J. M., Novaković, M. M., Pastor, F. T., Pezo, L., Battino, M., Sužnjević, D., Ž. (2013). Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30, 13-18.

Greenwood, D. (1993). Honey for superficial wounds and ulcers. *Lancet*, 341 (8837), 90-91.

Griebel, C., Hess, G. (1939). Vitamin C-enthaltende honige. *Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel*, 78, 308-314.

Griebel, C., Hess, G. (1940) The vitamin C content of flower nectar of certain Labiatae. *Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel*, 79, 168–171.

Guerrini, A., Bruni, B., Maietti, S., Poli, F., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Scalvenzi, L., Sacchetti, G. (2009). Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: a chemical and functional profile of an ancient health product. *Food Chemistry*, 114, 1413-1420.

Guler, A., Bakan, A., Nisbet, C., Yavuz, O. (2007). Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose. *Food Chemistry*, 105, 1119-1125.

Guyot-Declerck, C., Renson, S., Bouseta, A., Collin, S. (2002). Floral quality and discrimination of *Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia*, and *Lavandula angustifolia* x *latifolia* honeys. *Food Chemistry*, 79, 453-459.

Hamzaoglu, I., Saribeyoglu, K., Durak, H., Karahasanoglu, T., Bayrak, I., Altug, T., Sirin, F., Sariyar, M. (2000). Protective covering of surgical wounds with honey impedes tumor implantation. *Archives of Surgery*, 135, 1414-1417.

Hayakawa, K., Katsumata, N., Hirano, M., Yoshikawa, K., Ogata, T., Tanaka, T., Nagamine, T. (2008). Determination of biotin (vitamin H) by the high-performance affinity chromatography with a trypsin-treated avidin-bound column. *Journal of Chromatography B*, 869, 93-100.

Haydak, M. H., Palmer, L. S., Tanquary, M. C., Vivino, A. E. (1942). Vitamin content of honeys. *Journal of Nutrition*, 23, 581-588.

Capítulo VII. Bibliografía

He, H-Z., Li, H-B., Chen, F. (2005). Determination of vitamin B₁ in seawater and microalgal fermentation media by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383, 875-879.

Hermosín, I., Chicón, R. M., Cabezudo, M. D. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83, 263-268.

Herrera, J. (1989). Aminoácidos en el néctar de plantas del sur de España. *Anales Jardín Botánico de Madrid*, 45, 475-482.

Herrero-Martínez, J. M., Oumada, F. Z., Rosés, M., Bosch, E., Rafols, C. (2007). Determination of flavonoid aglycones in several food samples by mixed micellar electrokinetic chromatography. *Journal Separation Science*, 30, 2493-2500.

Heudi, O., Kiliç, T., Patric Fontannaz, P. (2005). Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: Application to polyvitaminated premixes. *Journal of Chromatography A*, 1070, 49-56.

Höller, U., Brodhag, C., Knöbel, A., Hofmann, P., Spitzer, V. (2003). Automated determination of selected water-soluble vitamins in tablets using a bench-top robotic system coupled to reversed phase (RP-18) HPLC with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 151-158.

Hoyle, E. (1929). The vitamin content of honey. *Biochemical Journal*, 23, 54-60.

Hucker, B., Wakeling, L., Vriesekoop, F. (2011). The quantitative analysis of thiamin and riboflavin and their respective vitamers in fermented alcoholic beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12278-12285.

Iglesias, M. T., de Lorenzo, C., Polo, M. C., Martín-Álvarez, P. J., Pueyo, E. (2004). Usefulness of amino acids composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 84-89.

Irish, J., Carter, D., Shokohi, T., Blair, S. (2006). Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Medical Mycology*, 44, 289-291.

Islam, A., Kahlil, I., Islam, N., Moniruzzaman, M., Mottalib, A., Sulaiman, S. A., Gan, S. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 177-187.

ISO 8589. (1998). Guide for the installation of a chamber for sensory analysis (p. 9). Group E.

Ivanovic, D., Popovic, A., Radulovic, D., Medenica, M. (1999). Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18, 999-1004.

Jean-Prost, P. (1985). Apicultura. 2ª edición. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España.

Jedliča, A., Klimeš, J. (2005). Determination of water- and fat-soluble vitamins in different matrices using high-performance liquid chromatography. *Chemical Papers*, 59, 202-222.

Jin, P, Xia, L., Li, Z., Che, N., Zou, D., Hu, X. (2012). Rapid determination of thiamine, riboflavin, niacinamide, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and ascorbic acid in vitamins with minerals Tablets by high-performance liquid chromatography with diode array detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, 151–157.

Kall, M.A., Nørgaard, P., Pedersen, S.J., Leth, T. (2000). Optimised extraction of folic acid from multivitamin-mineral preparations for liquid chromatographic analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23, 437–445.

Kaškonienė, V., Venskutonis, R. (1998). Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 620-634.

Kesić, A., Mazalovic, M., Crnkic, A., Catovic, B., Hadžidedic, S., Dragošević, G. (2009). The influence of L-ascorbic acid content on total antioxidant activity of bee-honey. *European Journal of Scientific Research*, 32, 95-101.

Khalil, M.I., Sulaiman, S.A. (2010). The potential role of honey and its polyphenols in preventing heart diseases: a review. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 7 (4), 315-321.

Capítulo VII. Bibliografía

Khalil, M.I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, Md. A., Islam, Md. N., Sulaiman, S.A., Gan, S.H. (2012). Physicochemical and Antioxidant Properties of Algerian Honey. *Molecules*, 17, 11199-11215.

Kilicoglu, B., Kismet, K., Koru, O., Oruc, M.T., Sorkum, K., Akkus, M.A. (2006). The scolical effects of honey. *Advances in Therapy*, 23, 1077–1083.

Kitzes, G., Schuette, H. A., Elvehjem, C. A. (1943). *The B vitamins in honey*. *Journal of Nutrition*, 26, 241-250.

Klejdus, B., Petrlová, J., Potešil, D., Adam, V., Mikelová, R., Vacek, J., Kizek, R., Kubán, V. (2004). Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by HPLC coupled with diode array detection. *Analitcal Chimica Acta*, 520, 57-67.

Koc, A., Silici, S., Ercal, B., Kasap, F., Hörmet-öz, H., Mavul- Buldu, H. (2008). Antifungal Activity of Turkish honey against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp: an in vitro evaluation. *Medical Mycology*, 47, 707-712.

Kozhanova, L.A., Fedorova, G.A., Baram, G.I. (2002). Determination of water- and fat-soluble vitamins in multivitamin preparations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 57, 40–45.

Krell, R. (1996). Value-added products from beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin No. 124. <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.HTM>

Krishna Kishorea, R., Sukari Halima, A., Nurul Syazanaa, M. S., Sirajudeenb, K. N. S. (2011). Tualang honey has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources. *Nutrition Research*, 31, 322-325.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancinifilho, J., Fett, R. (2005) Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, 25, 726-732.

Lachman, J., Hejtmánková, A., Sýkora, J., Karban, J., Orsák, M., Rygerová, B. (2010). Contents of major phenolic and flavonoid antioxidants in selected Czech honey. *Czech Journal of Food Science*, 5, 412-426.

Lammertyn, J., Veraverbeke, E. A., Irudayaraj, J. (2004). zNose™ technology for the classification of honey based on rapid aroma profiling. *Sensors and Actuators B*, 98, 54-62.

Latorre, M. J., Peña, R., Pita, C., Botana, A., García, S., Herrero, C. (1999). Chemometric classification of honeys according to their type. II. Metal content data. *Food Chemistry*, 66, 263-268.

Lazarević, K. B., Andrić, F., Trifković, J., Tešić, Z., Milojković-Opsenica, D. (2012). Characterisation of Serbian unifloral honeys according to their physicochemical parameters. *Food Chemistry*, 15, 2060–2064.

Leita, L., Muhlbachova, G., Cresco, S., Barbattini, R., Mondini, C. (1996). Investigation of the use of honey bees and honey bee product to assess heavy metals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*, 43, 1-9.

León-Ruiz, V., Vera, S., San Andrés, M. P. (2005). Validation of a screening method for the simultaneous identification of fat-soluble and water-soluble vitamins (A, E, B1, B2 and B6) in an aqueous micellar medium of hexadecyltrimethylammonium chloride. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 1568-1575.

León-Ruiz, V., Vera, S., González-Porto, A. V., San Andrés, M. P. (2011). Vitamin C and sugar levels as simple markers for discriminating Spanish honey sources. *Journal of Food Science*, 76, 356-361.

Li, K. (2002). Simultaneous determination of nicotinamide, pyridoxine hydrochloride, thiamine mononitrate and riboflavin in multivitamin with minerals tablets by reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, 16, 504-507.

Li, H., Chen, F., Jiang, Y. (2000). Determination of vitamin B12 in multivitamin tablets and fermentation medium by HPLC with fluorescent detection. *Journal of Chromatography A*, 891, 243-247.

Li, L.S., Da, S.L., Feng, Y.Q., Liu, M. (2004). Study on the chromatographic behavior of water-soluble vitamins on p-tert-butyl-calix[8]arene-bonded silica gel stationary phase by HPLC. *Talanta*, 64, 373-379.

Lichtenberg-Kraag, B. (2003). Infrared spectroscopy: The quality assurance in honey analysis. *Apidologie*, 34, 479-480.

Lichtenberg-Kraag, B., Hedtke, C., Bienefeld, K. (2001). Infrared spectroscopy in routine quality analysis of honey. *Apidologie*, 32, 1-8.

Capítulo VII. Bibliografía

Lin, S., Molan, P., Cursons, R. (2011). The controlled *in vitro* susceptibility of gastrointestinal pathogens to the antibacterial effect of manuka honey. In *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 30, 569-574.

Lin, J. M., Yamada, M. (2003). Microheterogeneous systems of micelles and microemulsions as reaction media in chemiluminescent analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 99-107.

Liu, J., Hsu, F., Tsai, J., Chan, P., Liu, J. Y., Thomas, G. N., Tomlinson, B., Lo, M., Lin, J. (2003). Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Life Science*, 73, 1543-1555.

López, B., Latorre, M. J., Fernández, M. I., García, M. A., García, S., Herrero, C. (1995). Chemometric classification of honeys according to their type based on quality control data. *Food Chemistry*, 55, 281-287.

Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee World*, 59 (4), 139-157.

Mancomunidad de Servicios de la Sierra de San Vicente. Agencia de Empleo y Desarrollo Local. Guía Sierra de San Vicente. Recuperado el 14 de enero de 2013. <http://www.sierrasanvicente.com/loultimoenlasierra/parte1.pdf>.

Manikis, I., Thrasyvoulou, A. (2001). La relación entre las características fisicoquímicas de la miel y los parámetros de sensibilidad a la cristalización. *Apiacta*, 36, 106-112.

Manresa González, A. (2005). Clasificación de mieles de abeja uniflorales mediante propiedades químicas, físicas y sensoriales. Tesis Doctoral. Universidad de la Habana, Cuba.

Markopoulou, C. K., Kagkadis, K. A., Koundourellis, J. E. (2002), An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B₁, B₆, B₁₂ in multivitamin tablets by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 1403-1410.

Markuze, Z. (1935). The vitamin content of honey. *Archiv Chemicji Farmacji*, 2, 175-182.

Marzałł, M.L., Lebieżńska, A., Czarnowski, W., Szefer, P. (2005). High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 1094, 91-98.

Martínez Pozo, M. A. (2004). Flora melífera conquense. Asociación provincial de apicultores de Cuenca. Diputación provincial de Cuenca, España.

Martos, I., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A. (2000). Identification of flavonoid markers for the botanical origin of Eucalyptus honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1498–502.

Maruyama, H., Sumitou, Y., Sakamoto, T., Araki, Y., Hara, H. (2009). Antihypertensive effect of flavonoids isolated from Brazilian Green propolis in spontaneously hypertensive rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32, 1244-1250.

Matei, N., Birghila, S., Dobrinas, S., Capota. P. (2004). Determination of vitamin C and some essential trace elements (Ni, Mn, Fe, Cr) in bee products. *Acta Chimica Slovenica*, 32, 95-101.

Mateo, R., Jimenez, M., Bosch-Reig, F. (1992). Evaluation of the color of some Spanish unifloral honey types as a characterization parameter. *Journal of AOAC International*, 75, 537-542.

Mateo, R., Bosch-Reig, F. (1998). Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars, and pH. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 46, 393-400.

Mattivi, F., Monetti, A., Vrhovška, U., Tonona, D., Andrés-Lacueva, C. (2000). High-performance liquid chromatographic determination of the riboflavin concentration in white wines for predicting their resistance to light. *Journal of Chromatography A*, 888, 121–127.

Markuze, Z. (1935). The vitamin content of honey. *Arch. Chemicji Farmacji*, 2, 175-182.

Maurizio, A. (1939). Untersuchungen zur quantitative Pollen analyse des honigs. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittel-Untersuchung und Hygiene*, 30, 27-72.

Capítulo VII. Bibliografía

Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., Henie, T. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 483-489.

Meda, A., Lamien, C., E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 571–577.

Miller, J. N., Miller, J. C. (2000). Statistics and chemometrics for analytical chemistry. Prentice Hall, Dorchester, Dorset, England, p 120.

Mine, Y., Ma, F., Lauriau, S. (2004). Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1088-1094.

Mittal, K. L., Lindman, B. (1984). Surfactants in solutions. Ed. Plenum Press, New York, EEUU.

Mohapatra, D.P., Thakur,V., Brar, S.K. (2011). Antibacterial efficacy of raw and processed honey. *Biotechnology Research International*, 2011; ID 917505, doi:10.4061/2011/917505.

Mohrig, W., Messner, R. (1968). Lysozym als antibacterielles agens im honig und bienengift. *Acta Biologica Medica Germanica*, 21, 85-95.

Molan, P. C.(1992). The antibacterial activity of honey 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, 73, 5-28.

Molan, P. C. (1996). Honey for treatment of infections. *Bee Informed*, 3, 6-9.

Molan, P. C. (2001). Why honey is effective as a medicine. 2. The scientific explanation of its effects. In“Honey and Healing,” Ed. P. Munn and R. Jones. International Bee Research Association, Cardiff, Reino Unido.

Molan, P. C. (2002). Selection of honey as a wound dressing. Waikato Honey Research Unit, University of Waikato. Recuperado el 2 de febrero de 2013 de: <http://honey.bio.waikato.ac.nz/selection.shtml>.

Molan, P. C. (2006). The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 5, 40-54.

Moniruzzaman, M., Khalil, M. I., Sulaiman, S. A, Gan, S. H. (2012). Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: a review. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative medicines*, 9(1), 36-42.

Montferrer-Pons, L., Capella-Peiró, M. E., Gil-Agustí, M., Esteve-Romero, J. (2003). Micellar liquid chromatography determination of B vitamins with direct injection and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, 984, 223-231.

Moreno, P., Salvadó, V. (2000). Determination of eight water- and fat- soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by HPLC. *Journal of Chromatography A*, 870, 207-215.

Muñoz, F. (1996). Plantas medicinales y aromáticas: Estudio cultivo y procesado. Ed. Grupo Mundi-Prensa Libros, Madrid, España.

Nagai, T., Tanoue, Y., Kai, N., Suzuki, N. (2012). Functional property of honey from *Echium vulgare*. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 614-620.

Nho, J. W., Hwang, I. G., Kim, H. Y., Lee, Y. R., Woo, K. S., Hwang, B. Y., Chang, S. J., Lee, J., Jeong, H. (2010). Free radical scavenging, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory and in vitro anticancer activities of ramie (*Bohemeria nivea*) leaves extracts. *Food Science and Biotechnology*, 19, 383-390.

Nollet, L. M. L. (2000). Food analysis by HPLC. Ed. Marcel Dekker, New York, EEUU, p 403-476.

Nozal Nalda, M. J., Bernal Yagüe, J. L., Diego Calva, J. C., Martín López, M. T. (2005). Classifying honeys from the Soria province of Spain via multivariate analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 311-319.

Odeh, I., Abu-Lafi, S., Dewik, H., Al-Najjar, I., Imam, A., Dembitsky, V. M., Hanus, L. O. (2007). A variety of volatile compounds as markers in Palestinian honey from *Thymus capitatus*, *Thymelaea hirsuta*, and *Tolpis virgata*. *Food Chemistry*, 101, 1393-1397.

Orantes, F. J. (2004). Mieles monoflorales de Granada. *Vida Apícola*, 25, 25-31.

Orantes, F. J., Torres, C. (2010). Características de las mieles producidas en la provincia de León. VI Congreso nacional de apicultura, Libro de actas p.23.

Capítulo VII. Bibliografía

Oroian, M., Amarici, S., Escriche, I., Gutt, G. (2013). Rheological aspects of spanish honeys. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 228-241.

Ortiz Valbuena, A., Silva, M. C. (1990). Caracterización cromática (CIE L*10 a*10 b*10) de las mieles de la Alcarria y zonas adyacentes. *Cuadernos de Apicultura*, 8, 8-11.

Ortiz Valbuena, A. (1992). Contribución a la Denominación de Origen de la miel de la Alcarria. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.

Ortiz Valbuena, A., Fernández Maeso, F. A., Subrá Muñoz de la Torre, E. (1996). Principales características de la miel de la Alcarria. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, España.

Ortiz-Chao, P., Gómez-Ruiz, J. A., Rastall, R. A., Mills, D., Cramer, R., Pihlanto, A., Korhonen, H., Jauregi, P. (2009). Production of novel ACE inhibitory peptides from β -lactoglobulin using Protease N Amano. *International Dairy Journal*, 19, 69-76.

Osseyi, E.S., Wehling, R.L., Albrecht, J.A. (1998). Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. *Journal of Chromatography A*, 826, 235-240.

Patil, S.S., Srivastava, A.K. (2012). Development and validation of rapid ion-pair RPLC method for simultaneous determination of certain B-complex vitamins. *Journal of AOA C International*, 95, 74-83.

Pei, C., Wolf, W. R. (2007). LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multivitamin dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 2441-2448.

Pérez, R. A., Iglesias, M. T., Pueyo, E., González, M., De Lorenzo, C. (2007). Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 360-365.

Perez-Arquillué, C., Conchello, P., Arifio, A., Juan, T., Herrera, A. (1994). Quality evaluation of Spanish rosemary (*Rosmarinus officinalis*) honey. *Food Chemistry*, 51, 207-210.

Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Arifio, A., Juan, T., Herrera, A. (1995). Physicochemical attributes and pollen spectrum of some unifloral Spanish honeys. *Food Chemistry*, 54, 167-172.

Pérez Prieto, S., Cancho Grande, B., García Falcón, S., Simal Gándara, J. (2006). Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages. *Food Control*, 17, 900-904.

Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A., Gambacorta, E. (2013). A comparative study on phenolic profile, vitamin C content and antioxidant activity of Italian honeys of different botanical origin. *International Journal of Food Science & Technology*, DOI 10.1111/ijfs.12169.

Persano Oddo, L., Baldi, E., Accorti, M. (1990). Diastatic activity in some unifloral honeys. *Apidologie*, 21, 17-24.

Persano Oddo L., Baldi E., Piazza M. G. (1986). Acidità e pH nei principali mieli uniflorali italiani. *Apicoltura*, 2, 145-154.

Persano Oddo, L., Bogdanov, S. (2004). Determination of honey botanical origin: problems and issues. *Apidologie*, 35, S2-S3.

Persano Oddo, L., Piazza, M. G., Sabatini, A. G., Accorti, M. (1995). Characterization unifloral honeys. *Apidologie*, 26, 453-465.

Persano Oddo, L., Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35, S38-S81.

Perveen, S., Yasmin, A., Khan, K.M. (2009). Quantitative simultaneous estimation of water soluble vitamins, riboflavin, pyridoxine, cyanocobalamin and folic acid in nutraceutical products by HPLC. *The Open Analytical Chemistry Journal*, 3, 1-5.

Petteys, B.J., Frank, E.L. (2011). Rapid determination of vitamin B₂ (riboflavin) in plasma by HPLC. *Clinica Chimica Acta*, 412, 38-43.

Phuapradit, W., Saropala, N. (1992). Topical application of honey in treatment of abdominal wound disruption. *Journal of Obstetrics and Gynecology*, 32, 381-384.

Piana, M. L., Persano Oddo, L., Bentabol, A., Bruneau, E., Bogdanov, S., Guyot Declerck, C. (2004). Sensory analysis applied to honey: state of the art. *Apidologie*, 35, S26-S37.

Piasenzotto, L., Gracco, L., Conte, L. (2003). Solid phase microextraction (SPME) applied to honey quality control. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 83, 1037-1044.

Capítulo VII. Bibliografía

Pichichero, E., Canuti, L., Canini, A. (2009). Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 89, 609-616.

Pichichero, E., Cicconi, R., Mattei, M., Muzi, M. G., Canini, A. (2010). Acacia honey and chrysin reduce proliferation of melanoma cells through alterations in cell cycle progression. *International Journal of Oncology*, 37, 973-981.

Plutowska, B., Chmiel, T., Dymerski, T., Wardencki, W. (2011). A headspace solid-phase microextraction method development and its application in the determination of volatiles in honeys by gas chromatography. *Food Chemistry*, 126, 1288-1298.

Pohl, P. (2009). Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 117-128.

Pohl, P., Sergiel, I., Steck, H. (2009). Determination and fractionation of metals in honey. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39, 276-288.

Pramau, E., Bianco-Prevot, A. (1995). Solubilization in micellar systems. Analytical and environmental applications. *Pure and Applied Chemistry*, 67, 551-559.

Prior Canales, M. L. (1989). La miel en la Alimentación Humana. Secretaría General de Estructuras Agrarias. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Hojas divulgadoras. Núm. 7/89 HD.

Przybyłowski, P., Wilczyńska, A. (2001). Honey as an environmental marker. *Food Chemistry*, 74, 289-291.

Pujolá, M., Sanz, A. (1994). Miel de castaño y retama. Determinación de la acidez libre y otros parámetros físico-químicos. *Vida Apícola*, 63, 56-60.

Pyrzyska, K., Biesaga, M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 7, 893- 902.

Radovic, B. S., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Gerboles, M., Ankla, E. (2001). Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chemistry*, 72, 511-520.

Ramis Ramos, G., García Álvarez-Coque, M.C. (2001). Quimiometría. Editorial Síntesis, Madrid, España, Cap. 7 y 8.

Ramos-Lledó, P., Vera, S., San Andrés, M. P. (2001). Determination of vitamins A and E in milk samples by fluorescence in micellar media. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, 369, 91–95.

Real Academia Española. (2001). Diccionario de la lengua española. 22ª edición. Ed.: Espasa Calpe, Madrid, España.

Robacker, D. C., Erickson, E. H. (1984). A bioassay for comparing attractiveness of plants to honeybees. *Journal of Apicultural Research*, 23, 199-203.

Rudenko, A.O., Kartsova, L.A. (2010). Determination of water soluble vitamin b and vitamin c in combined feed, premixes, and biologically active supplements by reversed phase HPLC. *Journal of Analytical Chemistry*, 65, 71-76.

Rufián-Henares, J. A., Morales, F. J. (2007). Functional properties of melanoidins: in vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Research International*, 40, 995 -1002.

Ruiz Matute, A. I. (2007). Desarrollo de nuevas metodologías para la caracterización de los carbohidratos de la miel y su utilidad en la detección de adulteraciones. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, España.

Ruiz-Ángel, M. J., Carda-Broch, S., Torres-Lapasió, J. R., García Álvarez-Coque, M. C. (2009a). Retention mechanisms in micellar liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216, 1798-1814.

Ruiz-Angel, M. J., García Álvarez-Coque, M. C., Berthod, A. (2009b). New insights and recent developments in micellar liquid chromatography. *Separation and Purification Reviews*, 38, 45-96.

Ruoff, K., Luginbüh, W., Künzli, R., Bogdanov, S., Bosset, J. O., Von Der Ohe, K., Von Der Ohe, W., Amado, R. (2006). Authentication of the botanical and geographical origin of honey by Front-Face Fluorescence Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6858-6866.

Russell, K.M., Molan, P.C., Wilkins, A.L., Holland, P.T. (1990). Identification of some antibacterial constituents of New Zealand manuka honey. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 38, 10-13.

Sáenz Lain, C., Gómez Ferreras, C. (2000). Mieles españolas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.

Capítulo VII. Bibliografía

Salonen, A. (2011). Boreal unifloral honeys: screening of composition and properties. Tesis doctoral. University of Eastern, Finlandia.

Samarghandian, S., Afshari, J. T., Davoodi, S. (2011). Honey induces apoptosis in renal cell carcinoma. *Pharmacognosy Magazine*, 7, 46-52.

San Andrés, M. P., Vera, S., Torre, M., (Eds). (2010). Recent advances in vitamin analysis. Research Signpost, Kerala, India.

San Andrés, M. P., Vera, S., Torre, M., Valiente, M. (2011). Retinol fluorescence in lecithin/n-butanol/water aggregates: a new improvement for its analysis in cosmetics without pretreatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 851-859.

San José Rodríguez, R., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., Sánchez-Mata, M.C. (2012). Simultaneous determination of vitamin B₁ and B₂ in complex cereal foods, by reverse phase isocratic HPLC-UV. *Journal of Cereal Science*, 55, 293-299.

Sanz, M. L., González, M., de Lorenzo, C., Sanz, J., Martínez-Castro, I. (2004). Carbohydrate composition and physico-chemical properties of artisanal honeys from Madrid (Spain): occurrence of *Echium* sp honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1577–1584.

Sanz, S., Sanz, M. (1994a). Humedad, cenizas y conductividad eléctrica de mieles de La Rioja. *Zubía*, 12, 143-158; (1994b). Valores de acidez (libre, láctónica y total) y pH de las mieles de La Rioja. *Zubía*, 12, 193-204.

Sarikaya, A. O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tunçel, M., Kolayli, S. (2009). Antioxidant activity and phenolic acid constituents of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) honey and propolis. *Journal of Food Biochemistry*, 33, 470-481.

Saxena, S., Gautam, S., Maru, G., Kawle, D., Sharma, A. (2012). Suppression of error prone pathway is responsible for antimutagenic activity of honey. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 625-633.

Schramm, D. D., Karim, M., Schrader, H. R., Holt, R. R., Cardetti, M., Keen, C. L. (2003). Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1732-1735.

Sechrist, E. L. (1925). The color grading of honey. U.S. Department of Agriculture, Dept. Circ. 364, 1-7.

Seijo, M. C., Aira, M. J., Jato, M. V. (1998). Distribución y características palinológicas de las mieles de *Eucalyptus gallegas*. *Botánica Complutense*, 22, 133-143.

Seijo, M. C., Jato, M. V., Aira, M. J., Iglesias, I. (1997). Unifloral honeys of Galicia (north-west Spain). *Journal of Apicultural Research*, 36, 133-139.

Senyuva, H. Z., Gilbert, J., Silici, S., Charlton, A., Dal, C., Gurel, N., Cimen, D. (2009). Profiling Turkish honeys to determine authenticity using physical and chemical characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3911-3919.

Serra Bonvehí, J. (1989). Características físico-químicas. Composición de la miel de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) producida en España. *Anales de Bromatología*, 41, 41-56.

Serra Bonvehí, J., Ventura Coll, F. (1995). Characterization of citrus honey (*Citrus* spp.) produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2053–2057.

Serrano, S., Villarejo, M., Espejo, R., Jodral, M. (2004). Chemical and physical parameters of Andalusian honey: classification of *Citrus* and *Eucalyptus* honeys by discriminant analysis. *Food Chemistry*, 87, 619-625.

Shelbourn, T., Williamson, L., Gillespie, T., Montgomery, R. (2008). ICP-MS detection for HPLC analyses of pharmaceutical product, *Spectroscopy Magazine*, Recuperado el 23 de diciembre de 2012 de <http://spectroscopyonline.findanalytichem.com/spectroscopy/ICP-MS/ICP-MS-Detection-for-HPLC-Analyses-of-pharmaceutic/ArticleStandard/Article/detail/493383>.

Silva, R. L., Videira, R., Monteiro, A. P., Valentão, P., Andrade, P. B. (2009). Honey from Luso region (Portugal): physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal*, 93, 73-77.

Singh, N., Bath, P. K. (1997). Quality evaluation of different types of Indian honey. *Food Chemistry*, 58, 129-133.

Singleton, A., Joseph, A., Rossi, J. P. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Snowdon, J. A., Cliver, D. O. (1996). Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 1-26.

Capítulo VII. Bibliografía

Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Fortuna, T. (2009). Antioxidant activity and phenolic composition of herb honeys. *Food Chemistry*, 113, 568–574.

Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Galkowska, D., Fortuna, T., Witczak, T. (2011). Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys. *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 528-534.

Soria, A. C., Montserrat González, M., de Lorenzo, C., Martínez-Castro, I., Sanz, J. (2005). Estimation of the honeydew ratio in honey samples from their physicochemical data and from their volatile composition obtained by SPME and GC-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 8, 817–824.

Speroni, E., Ferri, S. (1993). Gastroprotective effects in the rat of a new flavonoid derivative. *Acta Horticulturae*, 332, 249–252.

Staliskas, C. D. (2002). Micelle-mediated extraction as a tool for separation and preconcentration in metal analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 343-355.

Subdirección General de Estadística. (2011). Anuario de estadística 2011. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Catálogo General de Publicaciones Oficiales. Madrid. Recuperado el 21 de diciembre de 2012 de <http://www.marm.es>.

Subdirección General de Productos Ganaderos. (2012). El sector de la miel en cifras. Principales indicadores económicos en 2011. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

Subrahmanyam, M. (1991). Topical application of honey in treatment of burns. *British Journal of Surgery*, 78, 497-498.

Subrahmanyam, M. (1993a). Honey impregnated gauze versus polyurethane film (OpSite®) in the treatment of burns-a prospective randomised study. *British Journal of Plastic Surgery*, 46, 322-323.

Subrahmanyam, M. (1993b). Storage of skin grafts in honey. *Lancet*, 341, 63-64.

Subrahmanyam, M. (1994). Honey impregnated gauze versus amniotic membrane in treatment of burns. *Burns*, 24, 331-333.

Subrahmanyam, M. (1996). Honey dressing versus boiled potato peel in the treatment of burns: a prospective randomized study. *Burns*, 22, 491-493.

Subrahmanyam, M. (1997). A prospective randomised clinical and histological study of superficial burn wound healing with honey and silver sulfadiazine. *Burns*, 24, 157-161.

Subrahmanyam, M. (1999). Early tangential excision and skin grafting of moderate burns is superior to honey dressing: a prospective randomised trial. *Burns*, 25, 729-731.

Tang, X., Cronin, D.A., Brunton, N.P. (2006). A simplified approach to the determination of thiamine and riboflavin in meats using reverse phase HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 831-837.

Taormina, P. J., Niemira, B. A., Beuchat, L. R. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 217-225.

Temaru, E., Shimura, S., Amano, K., Karasawa, T. (2007). Antibacterial activity of honey from Stingless honeybees (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Polish Journal of Microbiology*, 56, 281-285.

Terrab, A., Díez, M. J., Heredia, F. J. (2002). Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chemistry*, 79, 373-379.

Terrab, A., Recamales, A. F., Hernanz, D., Heredia, F. J. (2004). Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chemistry*, 88, 537-542.

The National Honey Board. (2002). Honey-health and therapeutic qualities. Recuperado el 15 de febrero de 2013 de: www.biologiq.nl/UserFiles/CompendiumHoney2002.pdf

Thomas, D.P., Foley, J.P. (2007). Efficiency enhancements in micellar liquid chromatography through selection of stationary phase and alcohol modifier. *Journal of Chromatography A*, 1149, 282-293.

Thrasyvoulou, A., Manikis, J. (1995). Some physicochemical and microscopic characteristics of Greek unifloral honeys. *Apidologie*, 26, 441-452.

Capítulo VII. Bibliografía

Torre, M., Sánchez-Hernández, M., Vera, S., San Andrés, M. P. (2007). Improvement in retinol analysis by fluorescence and solid phase extraction (SPE) in micellar medium. *Journal Fluorescence*, 18, 487-497.

Tsiapara, A. V., Jaakkola, M., Chinou, I., Graikou, K., Tolonen, T., Virtanen, V., Moutsatsou, P. (2009). Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. *Food Chemistry*, 116, 702–708.

Tuberoso, C.I.G., Jerković, I., Bifulco, E., Marijanovic, Z., Congiu, F., Bubalo, D. (2012). Riboflavin and lumichrome in Dalmatian sage honey and other unifloral honeys determined by LC–DAD technique. *Food Chemistry*, 135, 1985-1990.

Tysset, C., Rousseau, M. (1981). Le problème du microbisme et de l'hygiène des miels du commerce. *Revue de Medecine Veterinaire*, 132(8/9), 591-592, 595-600. USDA

USDA, National Nutrient database. Recuperado el 28 de febrero de 2013 de: www.ndb.nal.usda.gov

Unike Manuka Factor Honey association: <http://www.umf.org.nz/>

Vázquez Odériz, M. L., Vázquez Blanco, M. E., López Hernández, J., Simal Lozano, J., Romero Rodriguez, M.A. (1994). Simultaneous determination of organic acids and vitamin C in green beans by liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 77, 1056-1059.

Vela, L., De Lorenzo, C., Pérez, R. A. (2007). Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *Journal of Science of Food Agricultural*, 87, 1069-1075.

Vidović, S., Stojanović, B., Veljković, J., Pražić-Arsić, L., Roglić, G., Manojlović, D. (2008). Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating HPLC method. *Journal of Chromatography A*, 1202, 155-162.

Vilegas, W., Sanommiya, M., Rastrelli, L., Pizza C. (1999). Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 403-406.

Viñas, P., López-Erroz, C., Balsalobre, N., Hernández-Córdoba, M. (2001). Comparison of ion-pair and amide-based column reversed-phase liquid chromatography for the separation of thiamine-related compounds. *Journal of Chromatography B*, 757, 301–308.

Viñas, P., López-Erroz, C., Balsalobre, N., Hernández-Córdoba, M. (2003). Reversed-phase liquid chromatography on an amide stationary phase for the determination of the B group vitamins in baby foods. *Journal of Chromatography A*, 1007, 77-84.

Viñas, P., Balsalobre, N., López-Erroz, C., Hernández-Córdoba, M. (2004a). Determination of vitamin B₆ compounds in foods using liquid chromatography with post-column derivatization fluorescence detection. *Chromatographia*, 59, 381-386.

Viñas, P., Balsalobre, N., López-Erroz, C., Hernández-Córdoba, M. (2004b). Liquid chromatographic analysis of riboflavin vitamers in foods using fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1789-1794.

Viñas, P., López-García, I., Bravo-Bravo, M., Briceño, M., Hernández-Córdoba, M. (2012). Dispersive liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography for thiamine determination in foods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 1059-1066.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Concise Reviews and Hypotheses in Food Science*, 9, 117-124.

Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Karapanou, A., Mantzourani, I., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A., Sdoufos, I., Bezirtzoglou, E. (2011). Antibacterial activity of different honeys against pathogenic Bacteria. *Anaerobe*, 17, 6, 375-379.

Von der Ohe, W., Persano, L., Piana, M., Morlot, M., Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35, S18-S25.

Vorwohl, G. (1964). Die Beziehungen zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachtmässigen Herkunft. *Anales de l' Abeille*, 7, 301-309.

Wallace, A., Eady, S., Miles, M., Martin, H., McLachlan, A., Rodier, M., Willis, J., Scott, R., Sutherland, J. (2009). Demonstrating the safety of manuka honey UMF® 20+ in a human clinical trial with healthy individuals. *British Journal of Nutrition*, 103, 1023-1028.

Capítulo VII. Bibliografía

Wang, J., Kliks, M. M., Qu, W., Jun, S., Shi, G., Li, Q. X. (2009). Rapid determination of the geographical origin of honey based on protein fingerprinting and barcoding using MALDI TOF MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10081–10088.

Wang, X. H., Andrae, L., Engeseth, N. J. (2002). Antimutagenic effect of various honeys and sugars against Trp-p-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6923-6928.

Weheida, S. M., Naguib, H. H., El-Banna, H. M., Marzouk, S. (1991). Comparing the effects of two dressing techniques on healing of low grade pressure ulcers. *Journal Medical Research Institute*, 12, 259-278.

Weston, R. J. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*, 71, 235-239.

Weston, R.J., Mitchell, K.R., Allen, K.L. (1999). Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chemistry*, 64, 295-301.

White, J. W. (1979). Spectrophotometric method for Hydroxymethylfurfural in honey. *Journal of AOAC International*, 62, 509-514.

White, J. W. (1992). Internal standard stable carbon isotope ratio method for determination of C-4 plant sugars in honey: collaborative trial study, and evaluation of improved protein preparation procedure. *Journal of AOAC International*, 75, 543-548.

White, J. W., Petty, J., Hager, R. (1958). Composition of honey II. Lactone content. *Journal of AOAC International*, 75, 41-49.

White, J. W. Jr., Riethof, M. L., Subers, M. H., Kushnir, I. (1962). Composition of american honeys. *Technical Bulletin*, 1261, 1-124.

White, J. W., Rudyj, O. N. (1978). The protein content in honey. *Journal of Apicultural Research*, 17, 234-238.

White, J. W., Subers, M. H., Schepartz, A. I. (1963). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 73, 57-70.

Wilczyńska, A. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of different types of Polish honey-a short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60, 309-313.

Wongyai, S. (2000). Determination of vitamin B₁₂ in multivitamin tablets by multimode high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 870, 217–220.

Woollard, D.C., Indyk, H.E., Christiansen, S.K. (2000). The analysis of pantothenic acid in milk and infant formulas by HPLC. *Food Chemistry*, 69, 201-208.

www.mieldelapuela.com/lapuelamiel.pdf , Miel de Asturias La Puela

Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Datta, N., Rayment, K. (2004a). Phenolic acids and abscisic acid in Australian Eucalyptus honeys and their potential for floral authentication. *Food Chemistry*, 86, 169–177.

Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., D’Arcy, B., Datta, N., Caffin, N., Rayment, K. (2004b). Flavonoid in Australian Malaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*, 37, 166–174.

Zafra-Gómez, A., Garballo, A., Morales, J.C., García-Ayuso, L.E. (2006). Simultaneous Determination of Eight Water-Soluble Vitamins in Supplemented Foods by Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4531-4536.

Zalibera, M., Staško, A., Šlebodová, A., Jančovičová, V., Čermáková, T., Brezová, V. (2008). Antioxidant and radical-scavenging activities of Slovak honeys – An electron paramagnetic resonance study. *Food Chemistry*, 110, 512–521.

Zandamela Mungói, E. M. F. (2008). Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Zeina, B., Othman, O., Al-Assad, S. (1996). Effect of honey versus thyme on Rubella virus survival in vitro. *Journal Alternative and Complementy Medicine*, 2, 354-348.

Zeina, B, Zohra, B.I., Al- Assad, S. (1997). The effects of honey on Leishmania parasites: an in vitro study. *Tropical Doctor*, 27, 36–38.

